

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ
КЛИНИКА ПО НЕФРОЛОГИЯ
УМБАЛ "СВЕТИ ИВАН РИЛСКИ" ЕАД - СОФИЯ**

д-р МАРИЯ ХРИСТОВА ХРИСТОВА

**ИМУНОГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ
СИГНАЛНИЯ ПЪТ НА ИНТЕРЛЕВКИН-17 ПРИ
СИСТЕМЕН ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС И
ЛУПУСЕН НЕФРИТ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”**

Научна специалност: 03.01.15 „Нефрология”

София, 2023

Дисертационният труд е представен на 137 стандартни печатни страници, онагледен с 40 фигури и 35 таблици. В библиографията са включени 292 заглавия. Във връзка с дисертационния труд са реализирани 3 публикации, от които едната в списание с импакт фактор 3,6 и 1 участие в научен форум.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на научния съвет към Катедра по вътрешно болести, МУ - София (16.05.2023г.) и е насочен за защита пред научно жури в състав:

Проф. д-р Боряна Петрова Делийска, дмн – вътрешен член

Доц. д-р Милена Красимилова Николова-Влахова, дм – вътрешен член

Проф. д-р Емил Кумчев, дм – външен член

Доц. д-р Велислава Димитрова Димитрова, дм – външен член

Доц. д-р Едуард Емил Тилкиян, дм – външен член

Резервни членове:

Доц. д-р Екатерина Иванова Иванова-Тодорова, дм – вътрешен член

Доц. д-р Александър Иванов Осиченко, дм – външен член

Материалите по защитата са на разположение в деловодството на Катедра по вътрешни болести

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на
18.09.2023 г. от 14.00ч. в аулата на УМБАЛ „Св. Иван Рилски”

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ВЪТРЕШНИ БОЛЕСТИ
КЛИНИКА ПО НЕФРОЛОГИЯ
УМБАЛ "СВЕТИ ИВАН РИЛСКИ" ЕАД - СОФИЯ**

д-р МАРИЯ ХРИСТОВА ХРИСТОВА

**ИМУНОГЕНЕТИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ
СИГНАЛНИЯ ПЪТ НА ИНТЕРЛЕВКИН-17 ПРИ
СИСТЕМЕН ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС И
ЛУПУСЕН НЕФРИТ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„Доктор”**

в професионално направление 7.1. Медицина от област на висше образование
7. Здравеопазване и спорт

Докторска програма „Нефрология”

Научни ръководители:

Проф. д-р Атанас Иванов Кундурджиев, д.м.

Доц. д-р Васил Венциславов Василев, д.м.

Официални рецензенти:

Доц. д-р Милена Красиминова Николова-Влахова, д.м. – вътрешен член

Доц. д-р Александър Иванов Осиченко, д.м. – външен член

София, 2023

ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

СЛЕ	Системен лупус еритематозус
АНА	Антинуклеарни антитела
АКЛА	Антикардиолипинови антитела
ЛН	Лупусен нефрит
мРНК	Матрична рибонуклеинова киселина
РААС	Ренин-ангиотензин-алдостеронова система
ACR	Американска асоциация по ревматология (American College of Rheumatology)
bp	Базични двойки
CD	Групова детерминанта (cluster of differentiation)
EMA	Европейска агенция по лекарствата
ERA(ERA-EDTA)	Европейска бъбречна асоциация
EULAR	Европейска лига за борба с реуматизма
FDA	Американска агенция по лекарствата и храните
GFR	Степен на гломерулна филтрация
HLA	Човешки левкоцитарни антигени
HRMA	High-Resolution Melting Analysis (Анализ на топенето с висока резолюция)
IFN	Интерферон
IF	Индиректна имуофлуоресценция
IL-1	Интерлевкин 1
IL-6	Интерлевкин 6
IL-10	Интерлевкин 10
IL-17	Интерлевкин 17
KDIGO	Kidney disease: improvement global outcomes
LD	Неравновесна връзка (linkage disequilibrium)
MHC	Главен комплекс на тъканната съвместимост
NFκB	Нуклеарен фактор kappa B
OR	Отношение на шансовете (Odd Ratio)
PCR	Полимеразна верижна реакция
rs	Референтен идентификационен номер на SNP (reference SNP)
SNP	Единичен нуклеотиден полиморфизъм
STAT	Сигнален трансдюсер и активатор на транскрипцията
TGF-β	Трансформиращ растежен фактор- β

TLR	Toll-like рецептор
TNF-α	Тумор некротизиращ фактор- α

ВЪВЕДЕНИЕ

Системният лупус еритематозус (СЛЕ) е автоимунно заболяване с неясна етиопатогенеза, водещо до органни увреди и инвалидизация на пациенти в трудоспособна възраст. Автоимунните болести и в частност СЛЕ са причина за смъртност при жени в млада и средна възраст, като засягането на бъбречните структури един от основните прогностични фактори за изхода от заболяването. При 7-31% от пациентите лупусният нефрит (ЛН) се установява още при поставяне на диагнозата СЛЕ, а 31-48% развиват клинично изявен ЛН в следващите 5 години. При проведена ПББ хистологични промени се откриват в 40 до 76% от пациентите със СЛЕ. Въпреки наличието на съвременните терапевтични възможности все още около 22% от пациентите с лупусен нефрит достигат до терминална бъбречна недостатъчност в рамките на 10 години.

Въпреки значителния технологичен напредък в молекулярната биология и медицината през XX и XXI век, етиологията на автоимунните болести остава неизяснена, а тяхното лечение продължава да бъде предизвикателство в съвременната клинична практика. Появяват се множество хипотези и теории, чиято цел е да бъдат обяснени нарушенията в хомеостазата на имунната регулация. Като цяло засега е приета идеята за многофакторното естество на автоимунните болести, в чиято патогенеза взимат участие екзогенни и ендогенни фактори. Към последните спадат променен имунен отговор с формирането на автоантитела, нарушения във вродения и придобития имунитет, хормонален и цитокинов дисбаланс, аберантно предаване на сигнала в downstream каскадните пътища, нарушения в процесите на апоптоза и клетъчно преживяване, генетична предразположеност.

Установеният цитокинов дисбаланс при много автоимунни болести е мотив за изясняване на механизмите, чрез които цитокините способстват за

възникването на патологичния процес. Предвид генетичния контрол, на който е подложена тяхната секреция, цитокиновите полиморфизми логично попадат във фокуса на множество изследвания. Счита се, че сред цитокините IL-17 има ключова роля за развитието на някои инфламаторни и голям спектър от аутоимунни заболявания. В подкрепа на участието му в патологичния процес са установените повишени серумни нива при пациенти със СЛЕ, както и повишеният брой Th17 клетки, отговорни за производството му.

Освен че биха могли да доведат до изясняването на някои патогенетични механизми, резултатите от провеждането на асоциативни проучвания биха могли да спомогнат и за откриването на нови диагностични маркери с прогностична стойност. Практическият принос от подобни данни е свързан с избора на терапевтична стратегия, възможност за прилагане на таргетна терапия и отдиференцирането на пациенти респондери от нон-респондери при употребата на анти-IL-17 лекарствени средства. Това би допринесло за индивидуализиран подход при определянето на лечението и стои в основата на развитието на съвременната фармакогенетика и създаването на нови лекарствени стратегии по пътя към персонализираната медицина.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящото проучване е да се изследва влиянието на IL-17A и генетични полиморфизми от сигналния път Th17/IL-17/IL-17R върху предразположението и клиничното протичането на системния лупус еритематозус и лупусния нефрит.

За постигане на целта си поставихме следните задачи:

- 1. Да се изследват серумните нива на IL-17A при здрави лица и пациенти с лупусен нефрит и да се определи ролята на този цитокин за развитието на болестта.
- 2. Да се определи влиянието на нуклеотидните полиморфизми (rs2275913, rs708567 и rs1800469) върху секрецията на IL-17A при здрави и болни лица
- 3. Да се определи значението на *IL-17A* rs2275913 (-197G/A) полиморфизма за възникване и изява на СЛЕ и лупусен нефрит.
- 4. Да се изследва ролята на *IL-17RC* rs708567 (+6313C/T) полиморфизма за развитие на заболяването и клиничното му протичане.
- 5. Да се определи ролята на *TGF-β* rs1800469 (-509C/T) полиморфизма за възприемчивостта към СЛЕ и лупусен нефрит и отношението му към IL-17 оста.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. МАТЕРИАЛИ

1.1. ИЗСЛЕДВАНИ ЛИЦА

Извършено беше асоциативно проучване от типа случай-контрола, обхващащо общо 154 индивида, разделени в две групи, посочени в таблица 1:

Таблица 1. Характеристика на изследваните групи:

Група	Диагноза	Брой	Мъже	Жени	Възраст				
					Средна	±SD	Медиана	Мин.	Макс.
Ігр.	Здрави лица	95	17	78	42.7	14.5	42.0	18	73
ІІгр.	Пациенти СЛЕ+ЛН	59	10	49	41.3	14.8	41.0	18	78

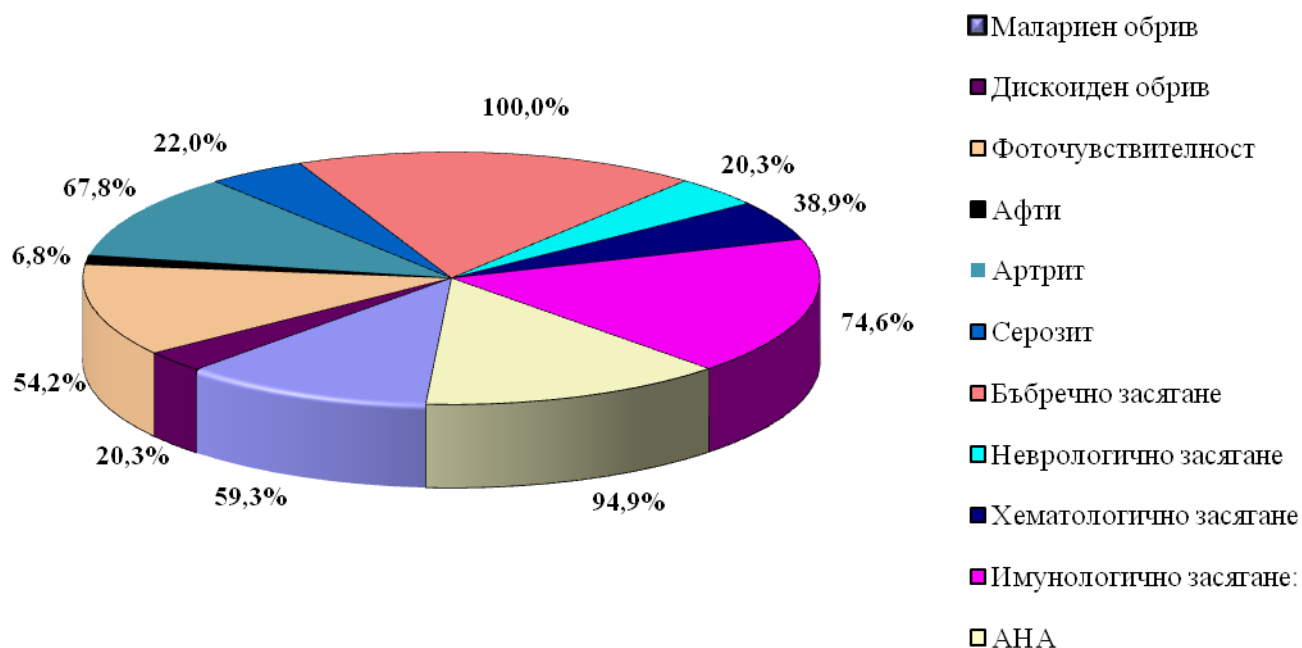
I-ва група - здрави лица

Контролната група се състои от 95 здрави неродствени индивиди, не проявяващи клинични признаци на аутоимунно заболяване, без анамнестични данни за фамилна обремененост, подбрани от биобанка към Молекулярен център по медицина, така че да съответстват по пол, възраст и етническа принадлежност на изследваните пациенти.

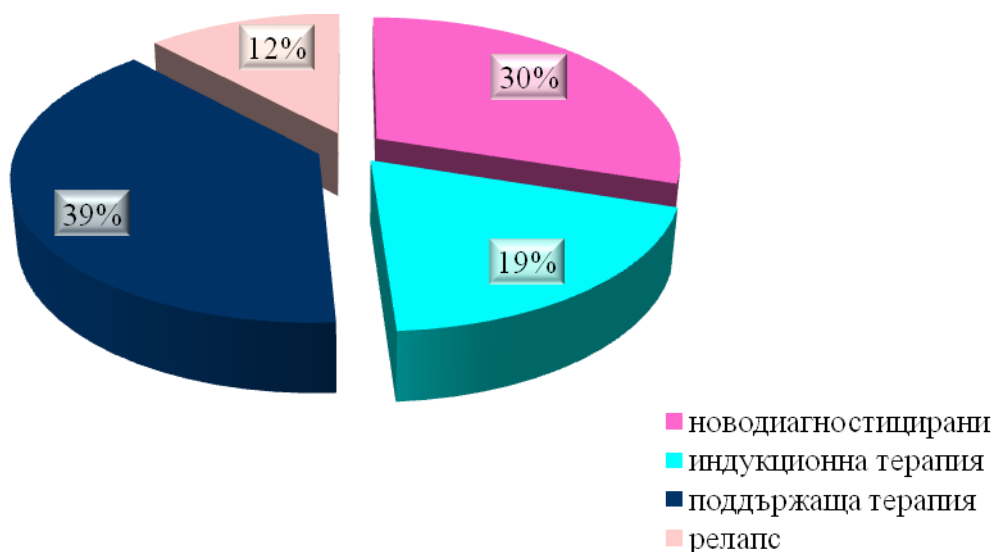
II-ра група - пациенти със СЛЕ

В периода от 2007-2019г. е извършен подбор на пациенти със СЛЕ и ЛН от Клиника по нефрология към УМБАЛ "Св. Иван Рилски", Клиника по нефрология към УМБАЛ "Александровска", Първа клиника по вътрешни болести, отделение по нефрология, към Медицински институт на МВР.

Диагнозата СЛЕ беше поставена на базата на модифицираните критерии на ACR от 1997 г., като процентното разпределение на клиничните признаци в групата на пациентите е представена на фигура 1. Наличието на ЛН бе верифицирано чрез хистологично изследване след проведена ПББ съгласно Класификация на лупусен нефрит ISN/RPS 2003.



Фигура 1. Характеристика на клиничните прояви при пациенти със СЛЕ според критериите на ACR 1997 г.



Фигура 2. Разпределение на изследваните пациентите спрямо терапевтичния режим.

Исключващи критерии – от всички групи бяха изключени пациенти с инфекциозни и малигнени заболявания, декомпенсирани състояния и други аутоимунни болести.

Всички изследвани лица са подписали писмено информирано съгласие за участие в проучването. Описаното изследване е проведено съгласно етичния кодекс на Световната лекарска асоциация (Декларацията от Хелзинки),

отнасящи се до експерименти с хора. Изследването също така е одобрено от Комисията по етика към Медицински университет – София по проект № 526/21.01.2016 г.

1.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

1.2.1. Материал за серологично изследване

Изолирането на серума ставаше след венепункция със затворена вакутейнерна система - серумна епруветка с гел на BD от 13ml, посредством центрофугиране 1000g/10 min. Отделеният серум се разпределяше в пластмасови контейнери тип Eppendorf, които се съхраняваха при -80°C . При определянето на антитела АНА, анти-ДНК, анти-Sm, антикардиолипинови антитела серумът се изработваше в рамките на 48 часа, поради което пробите бяха съхранявани при $+4^{\circ}\text{C}$.

1.2.2. Материал за генетично изследване и изолиране на ДНК

След подписване на информирано съгласие беше взимана венозната кръв в епруветка с обем 10 ml, съдържаща K₃EDTA (етилен диамин тетраацетат) на BD. ДНК се изолираше чрез машинна магнитна сепарация – Chemagen magnetic separation station чрез **кит за изолиране chemagic DNA Blood10k Kit на фирма PerkinElmer**. Получената ДНК се съхраняваше при -20°C в ДНК банка към Молекулярен медицински център МУ-София.

2. МЕТОДИ

2.1. СЕРОЛОГИЧНИ МЕТОДИ

2.1.1. Методи за определяне на серумни антитела*:

- ИФ за АНА при СЛЕ
- ELISA за анти-ДНК (скрининг), анти-Sm, анти-кардиолипинови ИгГ/ИгМ при СЛЕ

**Забележка: Процедурата е извършена съгласно СОП в Клиника по клинична имунология на УМБАЛ „Александровска”*

2.1.2. Методи за определяне на серумна концентрация на IL-17A

➤ За определяне на серумните нива на IL-17A беше използван Human IL-17A Platinum ELISA kit Affymetrix eBioscience™*

➤ Забележка: Процедурата беше извършена съгласно указанията на производителя.

2.2. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИ МЕТОДИ

За генотипизиране на изследваните полиморфизми бяха използвани методи ТаqMan анализ и HRMA анализ (high resolution melting analysis - анализ на топене с висока резолюция), посочени в таблица 2 за всеки полиморфизъм.

Таблица 2. Изследвани гени, единични полиморфизми в тях, номенклатура, метод

Ген	SNP	rs	Метод
<i>IL-17A</i>	-197 G/A	rs2275913	HRMA
<i>IL-17RC</i>	+6313 T/C	rs708567	ТаqMan
<i>TGFβ1</i>	-509 C/T	rs1800469	ТаqMan

ТаqMan реакцията и за двата полиморфизма е проведена съгласно инструкциите предоставени от Thermo Fisher Scientific в обем 5 µl. Използваните секвенции за rs708567 и rs1800469 са съответно GAAAAGTTTGGAGGAGCAGCTGACT[C/T]AGGGGTGGAGGAGCCTAGGAATGGT и GAGGAGGGGGCAACAGGACACCTGA[A/G]GGATGGAAGGGTCAGGAGGCAGAC.

Полиморфизмът IL-17A rs2275913 беше изследван чрез анализ на топене с висока резолюция. Последователността на двойките праймери са както следва F-5`-ACATGAATTTCTGCCCTTCC-3` и R-5`-GTTCAGGGGTGACACCATTT3.` Реакцията беше извършена в краен обем 25µl. Амплификационните условия включваха първоначална денатурация на 95°C за 3 минути, следвана от 45 цикъла от денатурация на 95°C за 15 секунди, анилинг 58°C за 20 секунди и елонгация на 72°C за 20 секунди. Анализът на топене бе проведен с нарастване от 70-98°C с 0.1 градуса

на всяка стъпка. Получените резултатите бяха анализирани с помощта на Rotor Gene 3000 Data Analysis software.

2.3. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ

Статистическата обработка на получените резултати беше направена с помощта на следните програми:

➤ SPSS 26.0

2.3.1. Описателни методи: Проведен беше вариационен анализ на количествените променливи – средна стойност, стандартно отклонение и/или стандартна грешка (за показателите с нормално разпределение) и медиана с минимална и максимална стойност, персентили 25-ти и 75-ти (за показателите с различно от Гаусовото разпределение), което е отразено и в графичните изображения.

2.3.2. Методи за проверка на хипотези

Проверка за нормалност на разпределението чрез тест на Колмогоров-Смирнов (Shapiro Wilk при пациенти под 50):

1. Параметрични (при нормалност на разпределението)

1.1. Т-тест за проверка на равенство между две независими извадки (Independent Samples T-test)

1.2. Еднофакторен дисперсионен анализ (One-way ANOVA) при сравняване на повече от две средни стойности.

1.3. Корелационен анализ по Pearson за изследване на връзка между две количествени променливи

2. Непараметрични (при разпределение различно от нормалното)

2.1. Тест на Mann-Whitney за сравняване на количествена променлива в две групи (представени са медиани);

2.2. Тест на Kruskal-Wallis за сравняване количествена променлива в повече от две групи (представени са медиани).

2.3. Болест-асоциираното проучване от типа случай-контрола беше осъществено чрез метод χ -квадрат или точен тест на Фишер (two-tailed

Fisher's exact test) при малки извадки. При множествени сравнения беше прилагана и корекция по Bonferroni. Допълнително беше изчислена стойността на отношението на шансовете (odd ratio=OR) в 95% доверителен интервал (95 % CI), измерващ относителния риск (шанс) за развитие на болестта при експозиция на анализирания фактор. Разгледани бяха доминантен, рецесивен и кодоминантен модел на генотипно взаимодействие (таблица 3). Този подход беше използван и при оценка на генотипно влияние на всеки от изследваните полиморфизми върху клиничните признаци при СЛЕ. С "NS" беше отбелязван общия случай, когато липваше статистическа значимост за всеки един от тях. При наличие на статистическа значимост тя беше допълнително графично представена.

2.4. Корелационен анализ по Spearman за изследване на връзка между две количествени променливи при асиметрично разпределение.

Таблица 3. Изследвани модели на генетично влияние.

Доминантен модел XX+XY	Рецесивен модел XX	Кодоминантен модел XX
уу	XY+уу	уу

Всички описани статистически методи бяха осъществени с програма SPSS 26.0 IBM

2.3.3. Методи за оценка на равновесието на Харди-Вайнберг

Чрез програма PLINK беше направена проверка за съответствие на получените резултати със закона на Харди-Вайнберг

**Забележка: за статистически достоверни се приеха стойности на $p < 0.05$*

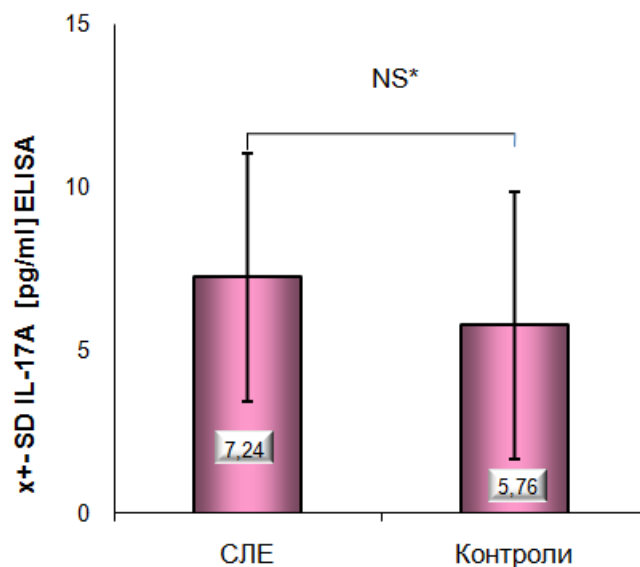
РЕЗУЛТАТИ

Въз основа на хипотезата за съществуването на цитокинов дисбаланс при болните със СЛЕ, сравнихме серумните нива IL-17A при болни и здрави лица и изследвахме 3 единични нуклеотидни полиморфизма в 3 ключови гени от сигналния път на IL-17 - а именно *IL-17A*, *IL-17RC* и *TGFβ1*.

1. СЕРУМНИ НИВА НА ИНТЕРЛЕВКИН - 17A (IL-17A) - РОЛЯ В ПАТОГЕНЕЗАТА НА СЛЕ/ЛН

1.1. Серумни нива на IL-17A при изследваните болни и здрави лица

За да се определи значението на IL-17A в патогенезата и клиничното протичане на СЛЕ и ЛН, серумните му нива бяха сравнени между 59 пациента със СЛЕ/ЛН и 95 неродствени здрави лица, съответстващи по пол и възраст. Средната концентрация в групата на пациентите е 7,24 pg/ml, а тази в групата на контролите е 5,76 pg/ml (фигура 3).

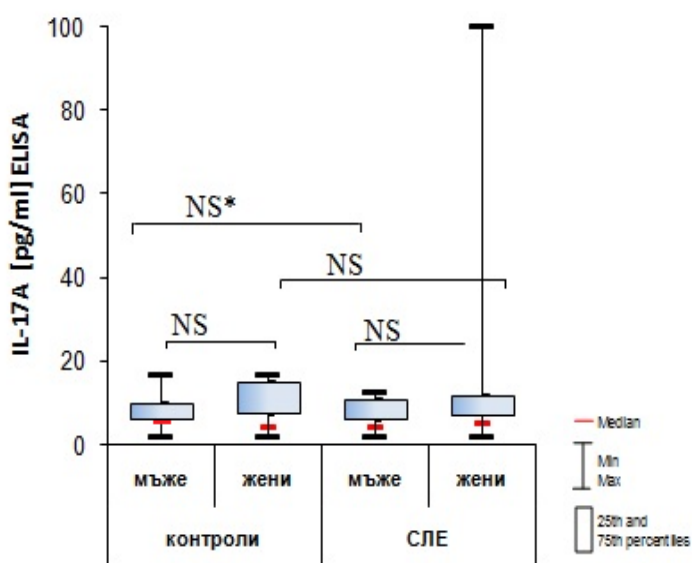


Фигура 3. Сравнение на концентрациите при пациенти със СЛЕ/ЛН и здрави контроли. Представени са средните стойности за всяка група и стандартното отклонение (\pm SD). Поради асиметричното разпределение на нивата на IL-17A се използва непараметричен тест Mann-Whitney U, при което между групите не беше установена статистически значима разлика ($p=0.667$). NS* - статистически несигнификантна разлика.

Чрез теста на Shapiro-Wilk се установи обаче, че разпределението на изследваната променлива (серумна концентрация на IL-17A) е асиметрично, поради което допълнително бяха определени медианите за всяка от изследваните групи, съответно 4.79 pg/ml за пациентите със СЛЕ/ЛН и 4.44 pg/ml за контролната група. Използван беше U тест на Mann–Whitney за непараметрични вариабилни, който показва, че разликите в медианите между пациентите със СЛЕ и здравите лица са статистически незначими ($p=0.667$).

1.2. Влияние на пола върху серумните нива на IL-17A

За да се оцени влиянието на пола върху продукцията на IL-17, всяка от изследваните групи – пациенти със СЛЕ/ЛН и здрави лица беше разделена на подгрупи - мъже/жени. При сравнение на нивата на цитокина между двата пола в рамките на всяка група не се установиха значими различия ($p>0.05$ и за двете групи) (фигура 4). Като следваща стъпка бяха сравнени концентрациите на IL-17A между съответните подгрупи - здрави и болни мъже и здрави и болни жени, при което също не се установиха статистически значими разлики (фигура 4).



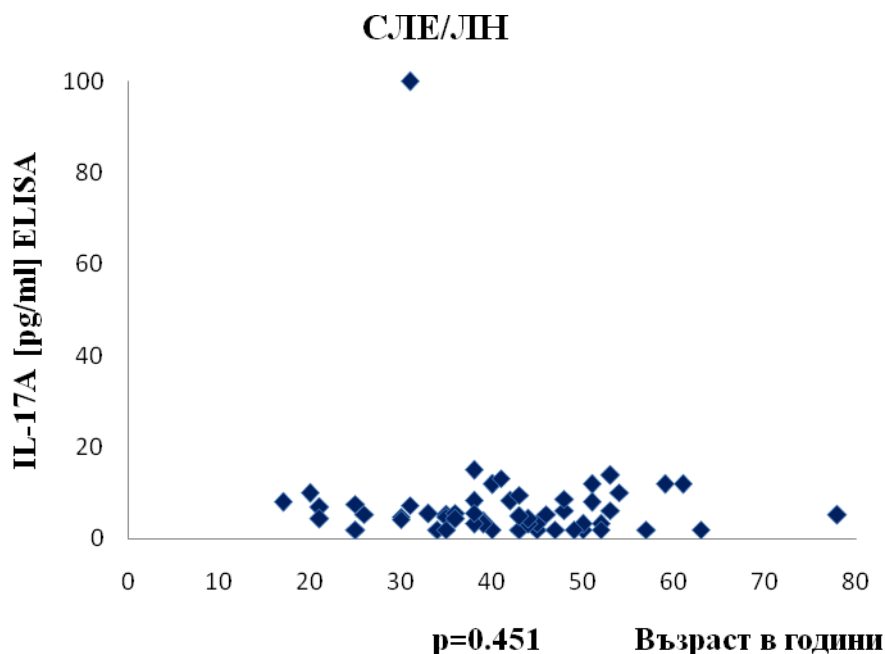
Фигура 4. Сравнение на концентрациите на IL-17 по пол. 1. при мъже и жени във всяка група и 2. между групите по признак пол. *Представена е липсата на статистически значима разлика (NS).

1.3. Влияние на възрастта върху серумните нива на IL-17A

Беше потърсена корелация между възрастта и нивата на IL-17A по метода на Spearman, но не беше установена значимост нито сред здравите лица ($p=0.766$) (фигура 5), нито сред пациентите ($p=0.451$) (фигура 6):



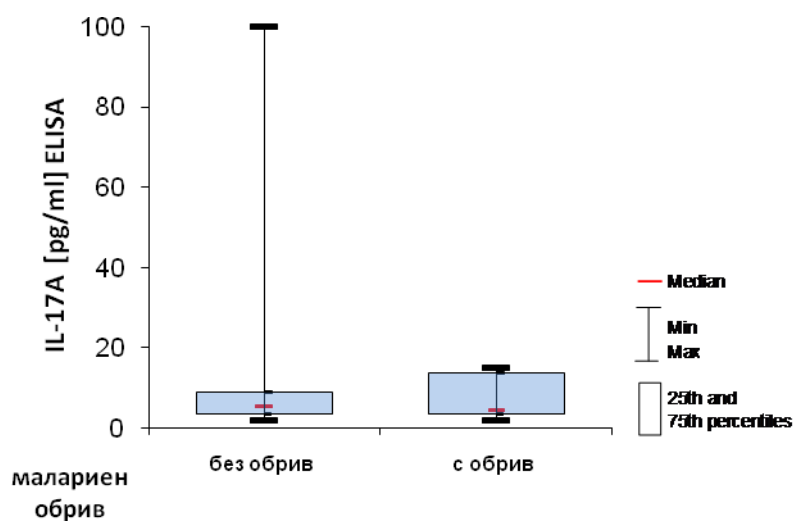
Фигура 5. Линеен корелационен анализ по Spearman между серумните нива на IL-17A и възрастта при здрави индивиди. Липсва статистическа значимост ($p>0.05$)



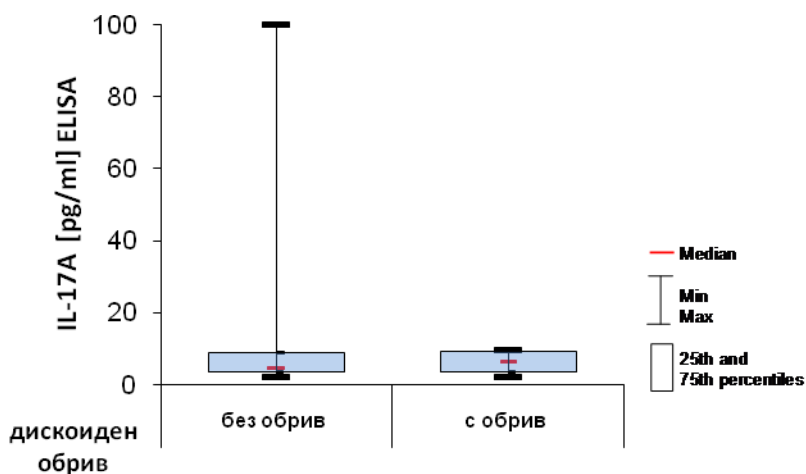
Фигура 6. Линеен корелационен анализ по Spearman между серумните нива на IL-17A и възрастта при пациенти с СЛЕ и ЛН. Липсва статистическа значимост ($p>0.05$)

1.4. Влияние на серумните нива на IL-17A върху клиничните признаци на СЛЕ

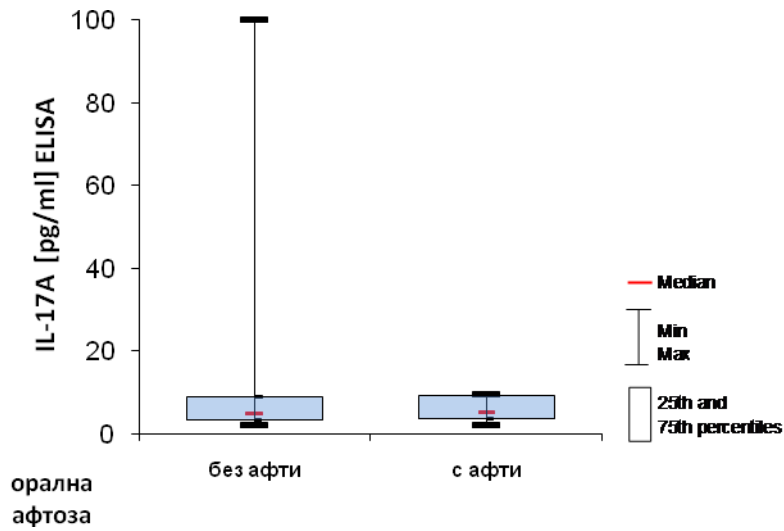
При определяне на връзката между серумните нива и клиничните признаци на СЛЕ, не бяха открити статистически значими резултати за нито един от показателите (фигура 7-15.)



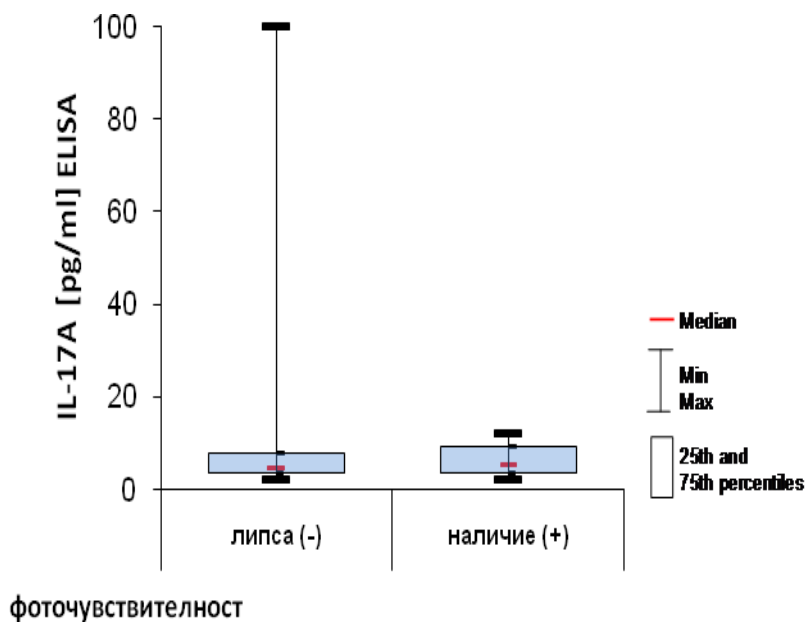
Фигура 7. Серумни нива на IL-17A при пациенти със СЛЕ/ЛН с и без малариен обрив. Липса на статистически значима разлика.



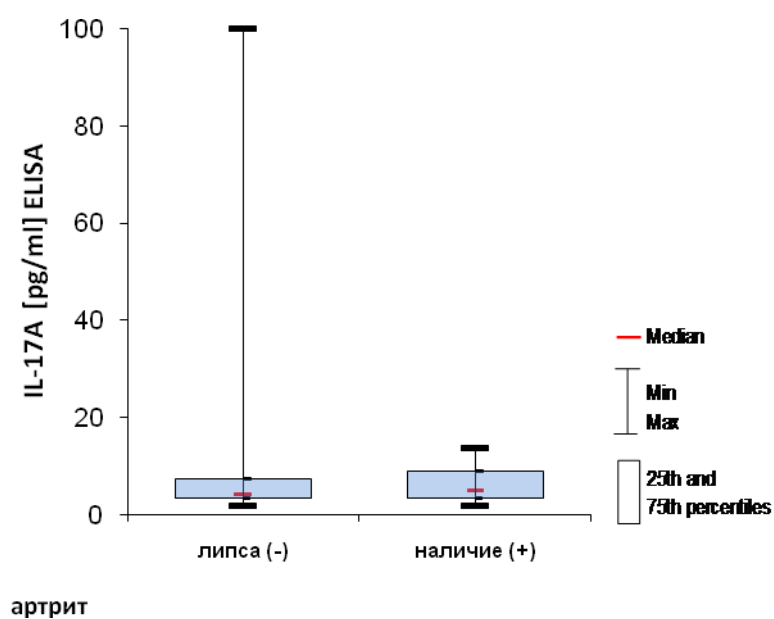
Фигура 8. Серумни нива на IL-17A при пациенти със СЛЕ/ЛН с и без дискоиден обрив. Липса на статистически значима разлика.



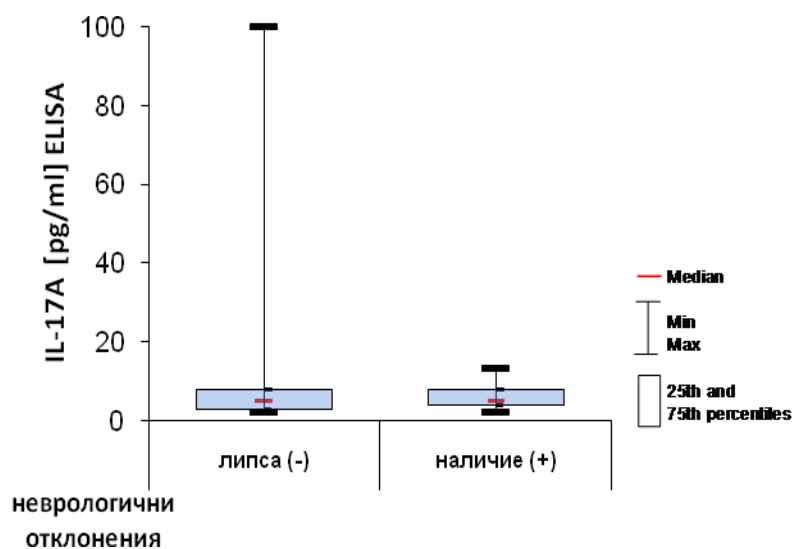
Фигура 9. Серумни нива на IL-17A при пациенти със СЛЕ/ЛН с и без орална афтоза. Липса на статистически значима разлика.



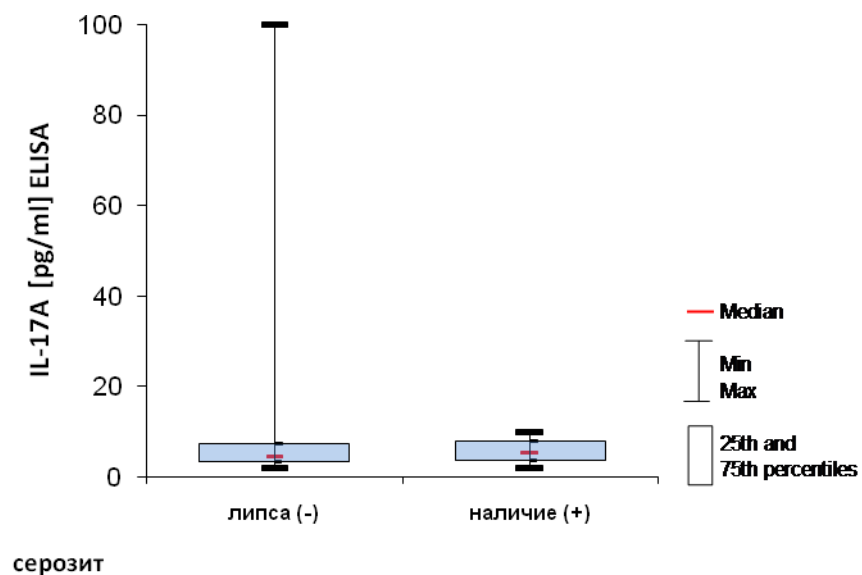
Фигура 10. Серумни нива на IL-17A при пациенти със СЛЕ/ЛН с наличие на и без фоточувствителност. Липса на статистически значима разлика



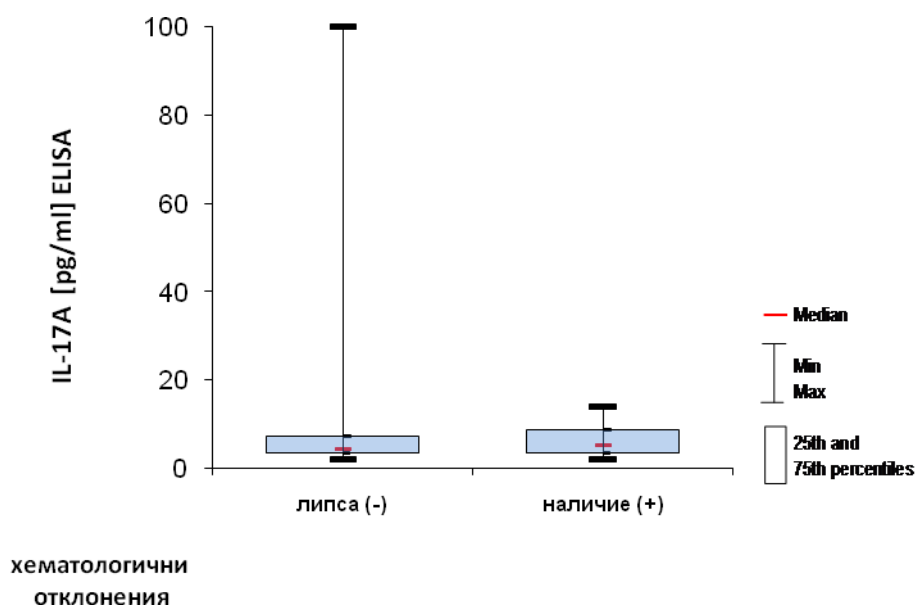
Фигура 11. Серумни нива на IL-17A при пациенти със СЛЕ/ЛН с и без неерозивен артрит. Липса на статистически значима разлика



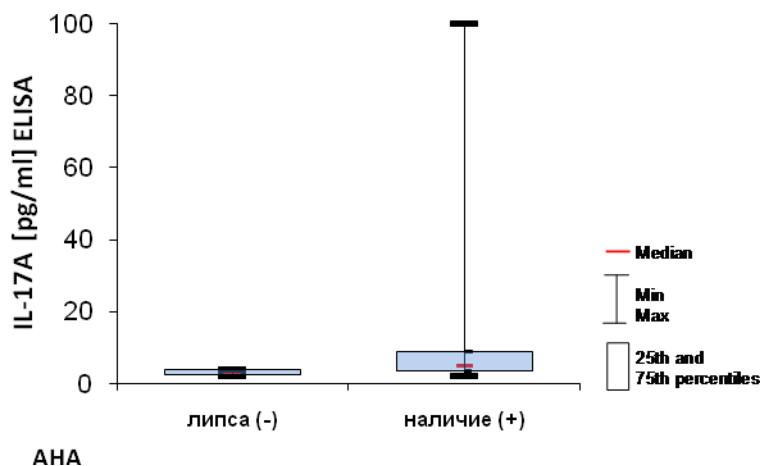
Фигура 12. Серумни нива на IL-17A при пациенти със СЛЕ/ЛН с и без неврологично засягане. Липса на статистически значима разлика.



Фигура 13. Серумни нива на IL-17A при пациенти със СЛЕ/ЛН с и без серозит. Липса на статистически значима разлика.



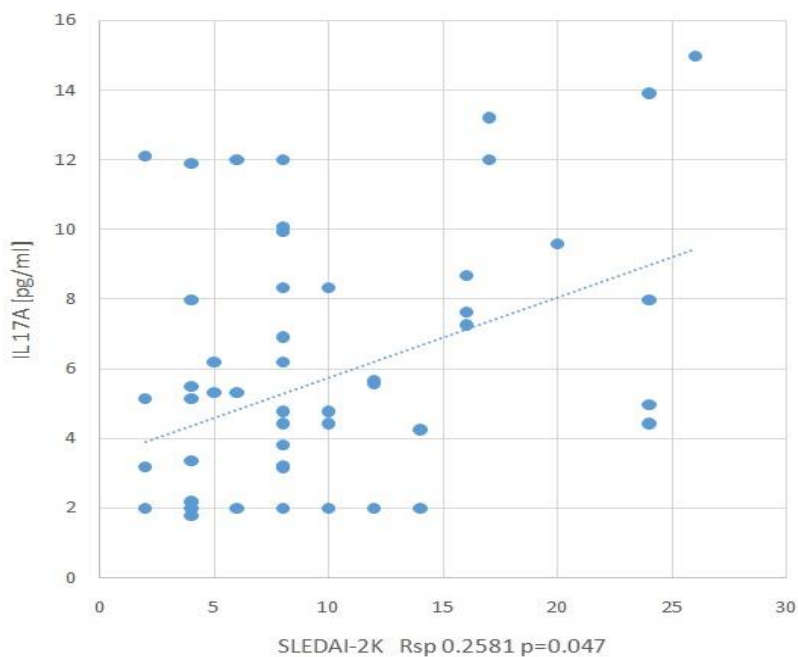
Фигура 14. Серумни нива на IL-17A при пациенти със СЛЕ/ЛН с и без на хематологично засягане. Липса на статистически значима разлика.



Фигура 15. Серумни нива на IL-17A при пациенти със СЛЕ/ЛН с и без наличие на АНА. Липса на статистически значима разлика.

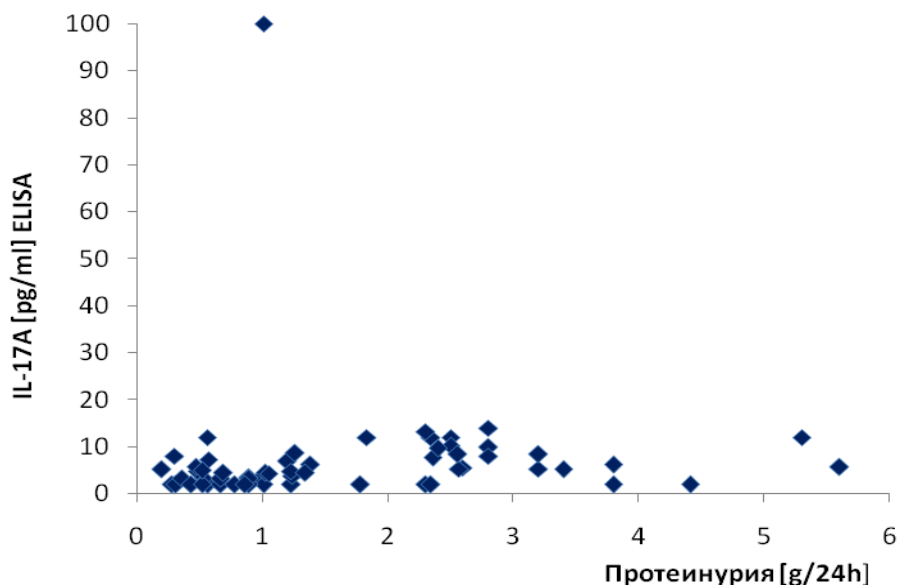
1.5. Връзка на серумните нива на IL-17A и активност на СЛЕ/ЛН

Въпреки че IL-17A не показва различия по отношение на отделните клинични признаци на СЛЕ, при проведения корелационен анализ по Spearman се установи статистически значима положителна корелация между нивата на IL-17A и индекса за активност на заболяването SLEDAI-2K (Rsp 0.258, p=0.047) (Фигура 16).



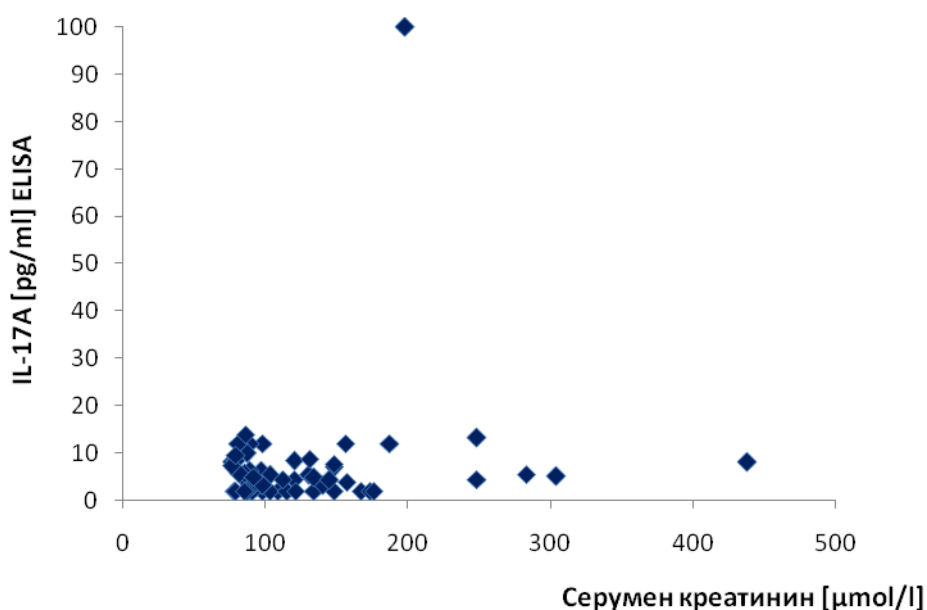
Фигура 16. Графично представяне на положителната корелация между серумни нива на IL-17A и индекса на активност на СЛЕ - SLEDAI-2K. Rsp - коефициент на корелация по Spearman.

От проведените изследвания относно лупусния нефрит се установи положителна корелация между серумните нива на IL-17 и протеинурията (фигура 17).



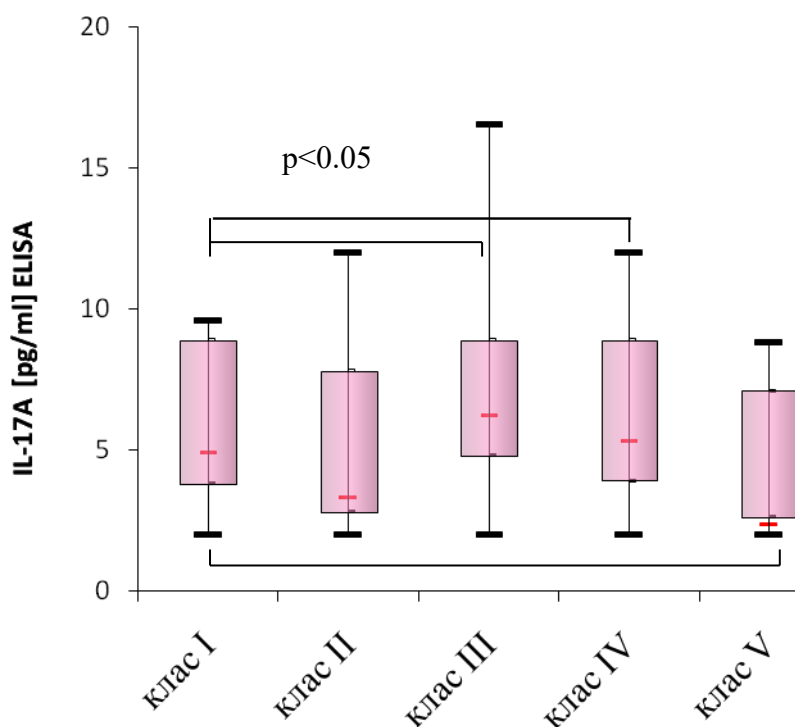
Фигура 17. Графично представяне на положителната корелация между серумните нива на IL-17A и количеството белтък в 24ч урина при пациенти със СЛЕ/ЛН.

Между нивата на IL-17A и серумния креатинин не се установи статистически значима връзка (фигура 18).



Фигура 18. Графично представяне на липсата на зависимост между серумните нива на IL-17A и серумния креатинин при пациенти със СЛЕ/ЛН.

Извършен бе и анализ на нивата на IL-17A по класове на ЛН. Най-високи нива бяха наблюдавани в пролиферативните класове - III и IV клас, а най-ниски в клас V, като статистическият анализ потвърди значимостта на различията ($p < 0.05$) (фигура 19). Средната на IL-17A за клас I беше 5.0 при медиана 4.8, а за клас II съответно средна 5.38 и медиана 3.29. В клас III и IV бяха отчетени съответно най-високите средни от 7.11 и 6.0 и най-високи медиани 6.20 и 5.32. Изследваните пациенти с клас V показаха ниски стойности както за средната 3.22, така и за медианата 2.36. Анализ при клас VI не беше проведен, т.к. само двама от изследваните пациенти попадат в тази група и получените резултати не биха били статистически достоверени.

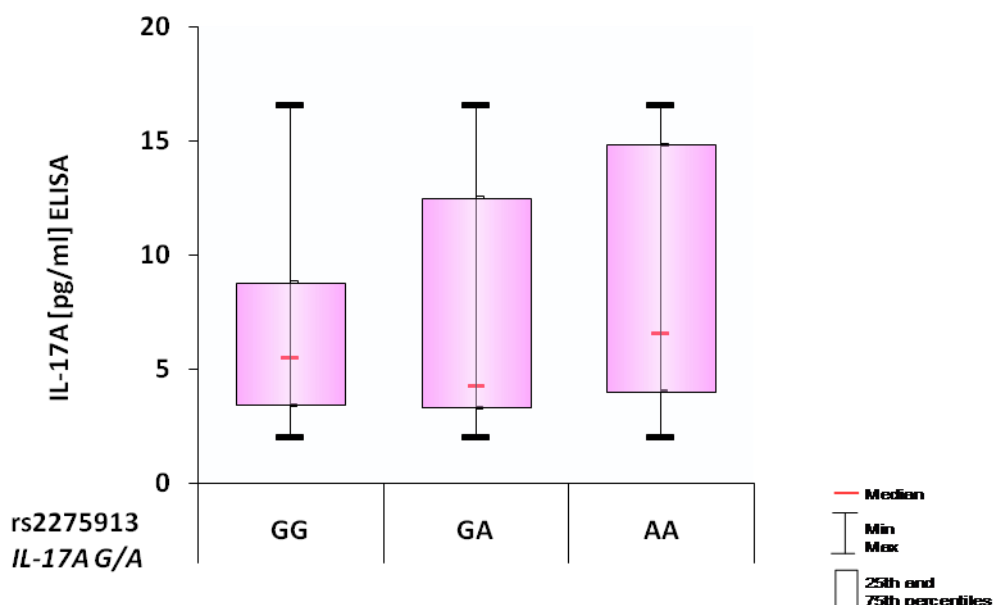


Фигура 19. Графично представяне на нивата на IL-17A при пациенти със СЛЕ/ЛН по класове на лупусния нефрит. Статистически значимо по-високи нива се наблюдават в пролиферативните класове - III и IV, а най-ниски нива бяха отчетени за клас V ($p < 0.05$).

2. ГЕНОТИПНО ВЛИЯНИЕ НАВЪРХУ ПРОДУКЦИЯТА НА IL-17A ПРИ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ЗДРАВИ И БОЛНИ ЛИЦА

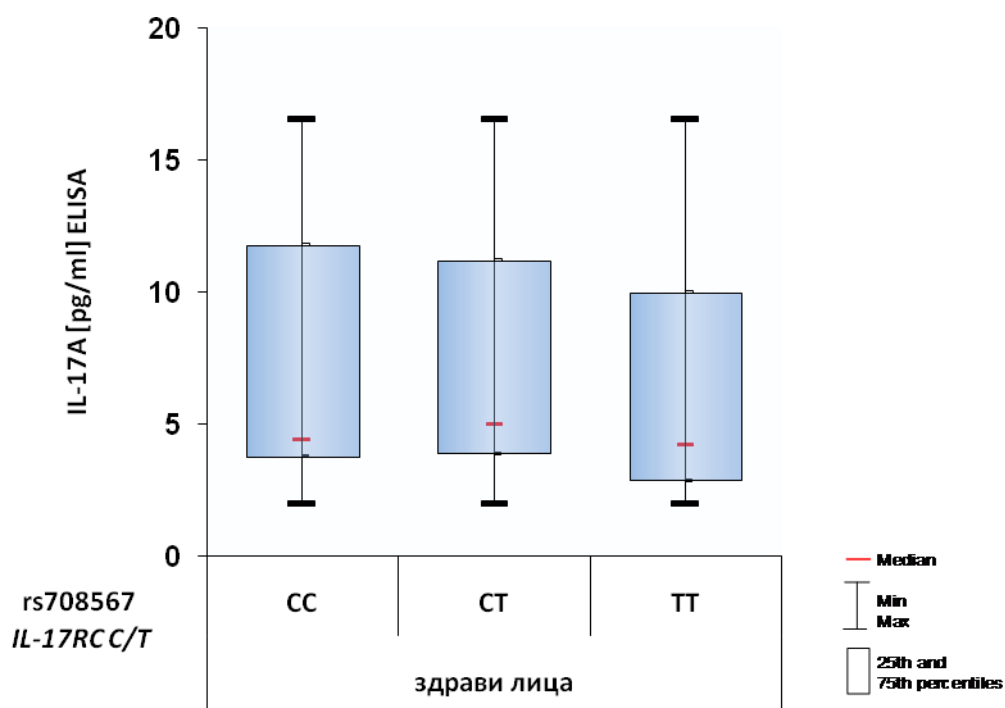
2.1. Генотипно влияние на изследваните полиморфизми върху продукцията на IL-17A при здрави лица

За да се определи влиянието на *IL-17A* (-197G/A) rs 2275913 върху продукцията на IL-17A бяха изследвани нивата на IL-17A сред здравите лица. Най-висока средна стойност на IL-17A беше измерена за лицата с генотип AA - 8.11 pg/ml при медиана 6.56 pg/ml. Най-ниски стойности бяха отчетени за хетерозиготите (GA) - съответно средна 5.07 pg/ml и медиана 4.26 pg/ml. Средната при генотипа GG беше 6.09 pg/ml, а медианата - 5.49 pg/ml. Статистическият анализ показва, че различията не достигат статистическа значимост (фигура 20).



Фигура 20. Генотипно разпределение на IL-17A (-197G/A) rs2275913 полиморфизма и серумните нива на IL-17A. Липса на статистически значима разлика при сравняване на нивата на IL-17A по генотип.

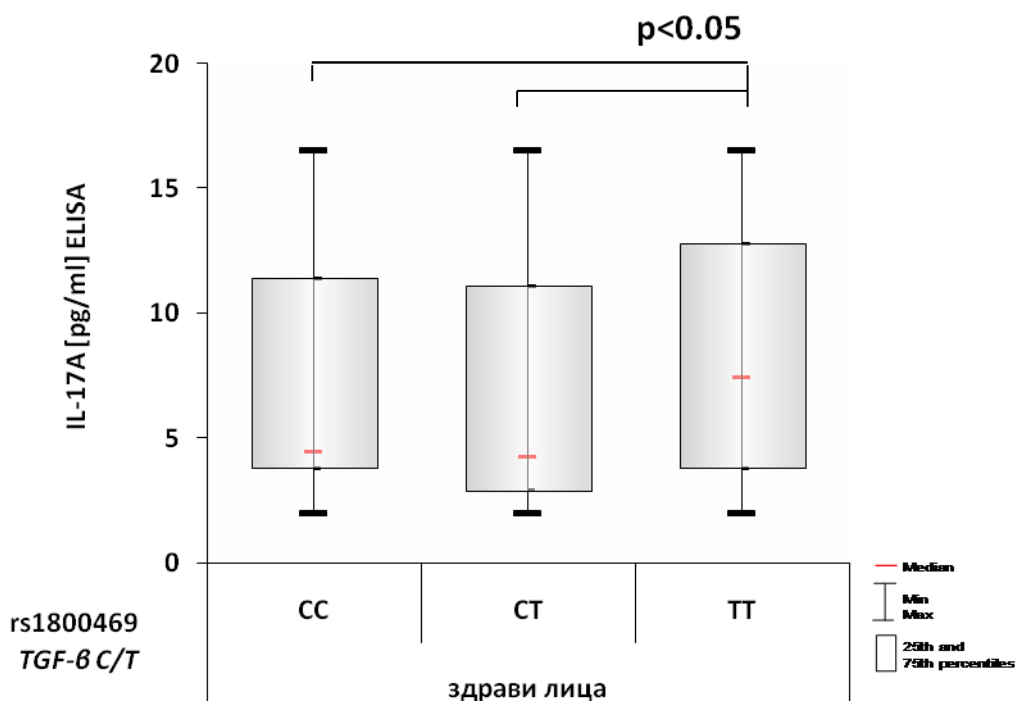
Относно *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 полиморфизма средната за хомозиготите по С алела беше 5.25 pg/ml при медиана 4.44 pg/ml, а средната за хомозиготите по Т алела - 5.32 pg/ml при медиана 4.26 pg/ml. Най-висока средна и медиана бяха отчени за хетерозиготите (СТ) съответно 6.30 pg/ml и 5.03 pg/ml. Направеният статистически анализ показва, че между отделните генотипи на полиморфизма *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 липсва статистически значима разлика в концентрацията на IL-17A (фигура 21).



Фигура 21. Генотипно разпределение на *IL-17RC* (+6313 C/T) rs708567 полиморфизма и серумните нива на IL-17A. Липса на статистически значима разлика при сравняване на нивата на IL-17A по генотип.

Единствено полиморфизмът *TGF-β* rs18000467 (-509T/C) показва статистически значима разлика в нивата на IL-17A при сравнението по генотип. При хомозиготите по С алела генотипа беше установена средна 5.76 pg/ml при медиана 4.44 pg/ml, а при хетерозиготите (СТ) изчислената средна беше 4.78 pg/ml при медиана 4.26 pg/ml. При хомозиготите по Т

алела се установиха най-високи стойности - средна 8.88 pg/ml и медиана 7.44 pg/ml. От направения непараметричен тест се установи, че -509ТТ генотипът се асоциира със значимо по-високи нива на IL-17A в сравнение с генотипите СС и СТ (фигура 22).

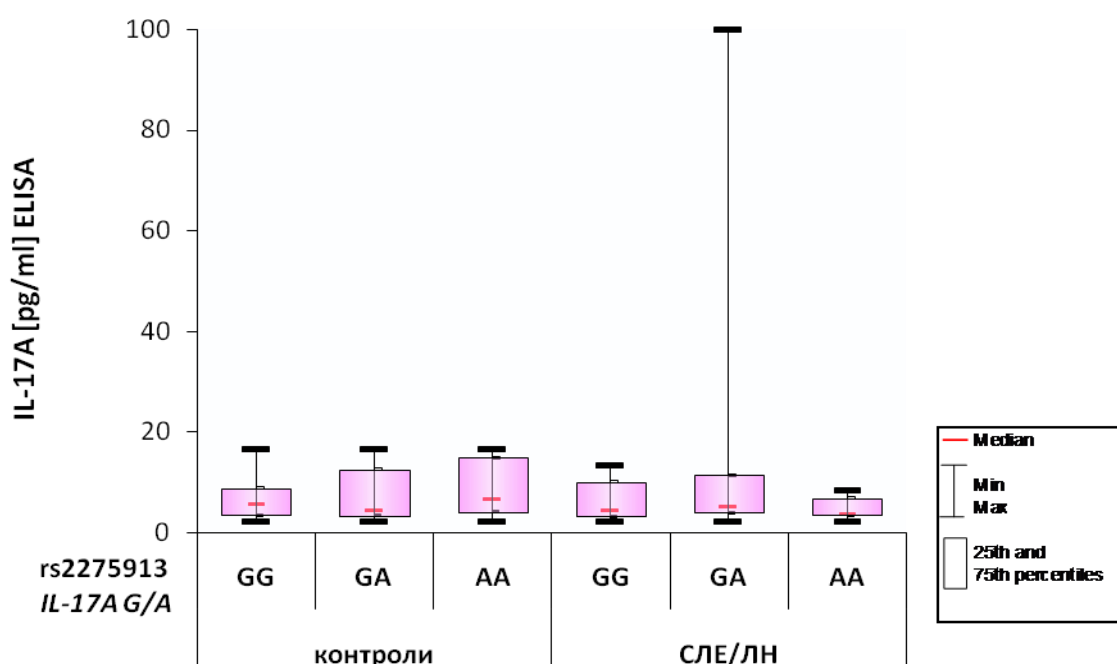


Фигура 22. Връзка на *TGFβ* (-509C/T) rs1800469 полиморфизма и серумните нива на IL-17A. Представена статистически значима асоциация на -509ТТ генотипа с по-високите нива на IL-17A в сравнение с генотипите СС и СТ.

От получените резултати може да се обобщи, че генотипните различия в полиморфизмите *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 и *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 не показаха значими разлики в продукцията на IL-17A при здрави лица, а *TGFβ* -509ТТ генотипът от rs1800469 полиморфизма се асоциира с високи нива на IL-17A.

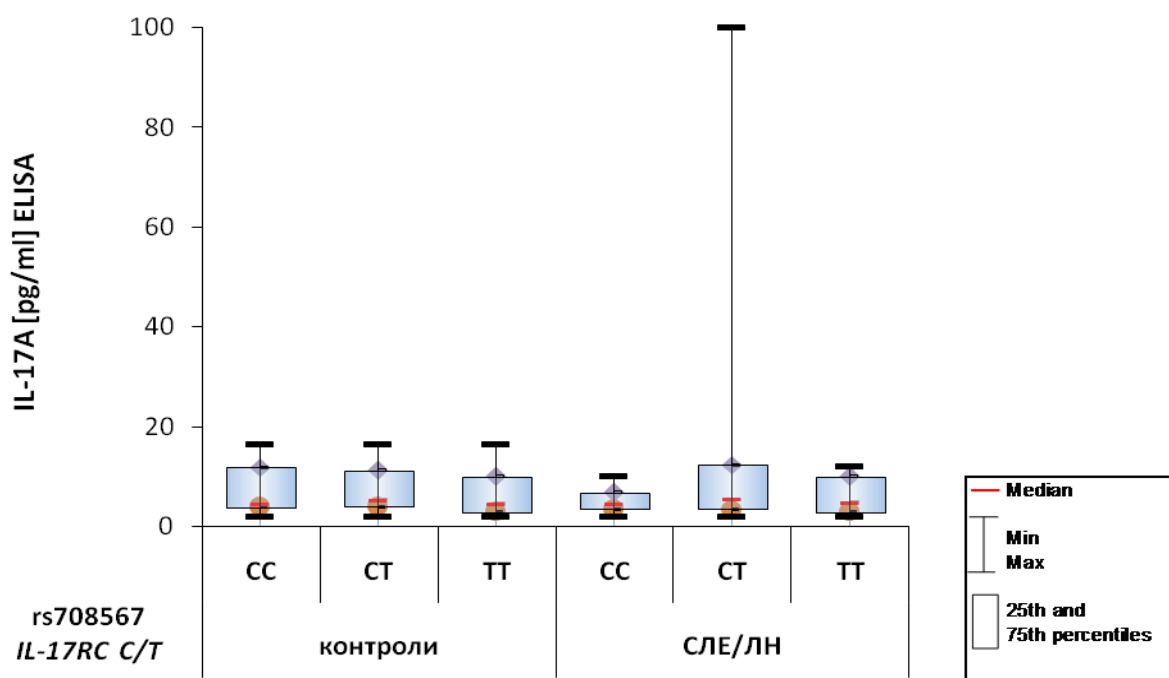
2.2. Генотипно влияние върху продукцията на IL-17A при пациенти със СЛЕ/ЛН

За да се оцени ролята на полиморфизмите върху продукцията на IL-17A в условията на болестния процес и да се оцени влиянието на патологичните фактори, от една страна бяха сравнени нивата на IL-17A между различните генотипи сред пациентите със СЛЕ/ЛН (вътрегрупов анализ), а от друга страна беше направено сравнение за идентичните генотипи между болните и здравите лица (междугрупов анализ). При сравнението на серумни нива на IL-17A в полиморфизма *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 сред пациентите със СЛЕ/ЛН, не се установиха статистически значими разлики. Липса на статистическа значимост беше отчетена и при сравнение на нивата на IL-17A по генотип между групите болни и здрави лица (фигура 23).



Фигура 23. Серумни нива на IL-17A спрямо генотипите от полиморфизма *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 при здрави и болни лица. Липса на статистическа значимост както при вътрегруповия анализ сред пациентите, така и при сравнение на нивата на IL-17A по генотипи между групите болни и здрави лица.

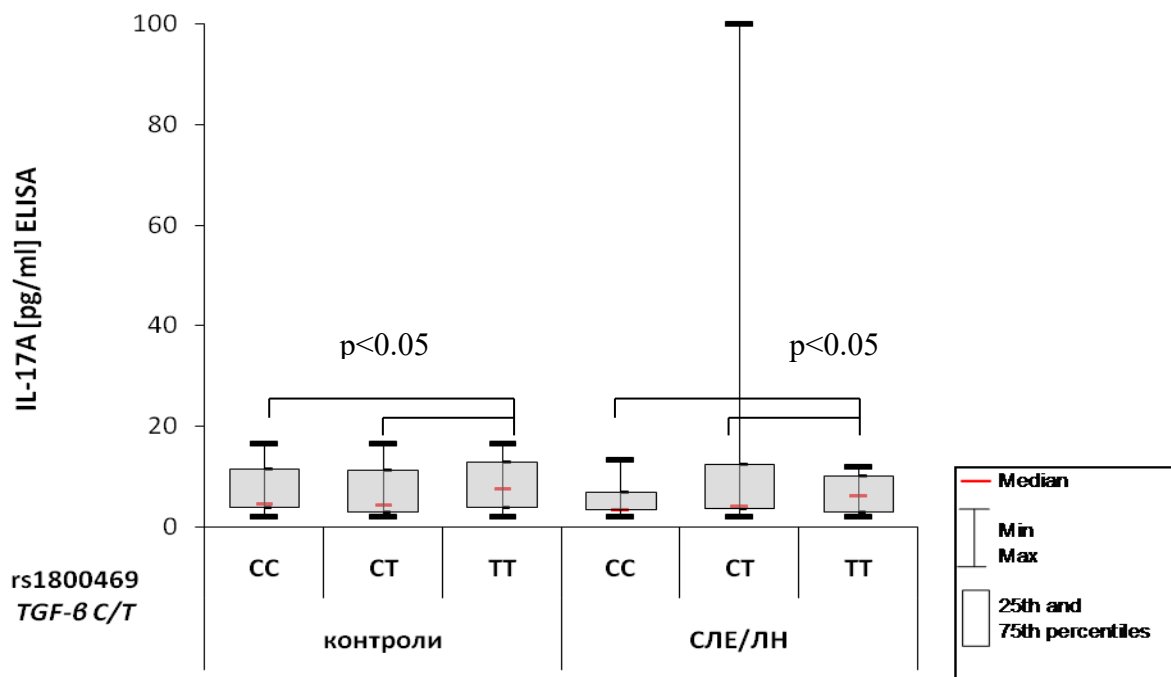
Подобни резултати бяха получени и относно полиморфизма *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567. При сравнение на нивата на IL-17A в групата на СЛЕ/ЛН по генотип не беше установена статически значима разлика (фигура 24). Сравнителният анализ между двете групи по идентичен генотип също не показва значими различия (фигура 24).



Фигура 24. Серумни нива на IL-17A спрямо генотипите от полиморфизма *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 полиморфизма при здрави и болни лица. Липса на статистическа значимост както при вътрегруповия анализ сред пациентите, така и при сравнение на нивата на IL-17A по генотипи между групите болни и здрави лица.

Както при здрави лица, така и сред пациентите със СЛЕ/ЛН *TGF-β* (-509C/T) rs18000467 показва статистически значима разлика в нивата на IL-17A. При пациентите с генотип CC беше установена средна 5.42 при медиана 3.48, при хетерозиготите (CT) средната беше 8.28 при медиана 4.04, а при пациентите с генотип TT беше изчислена средна 6.72 при медиана 6.2. Чрез непараметричен тест се установи, че -507TT генотипът се асоциира със значимо по-високи нива на IL-17A в сравнение с

генотипите СС и СТ и при пациентите със СЛЕ/ЛН (фигура 25). От извършения сравнителен анализ за нивата на IL-17A при идентичните генотипи между групите болни и здрави лица, не бяха установени статистически значими разлики.



Фигура 25. Връзка на полиморфизма TGFβ (-509C/T) rs1800469 със серумните нива на IL-17A в зависимост от генотипа при здрави лица и при пациенти със СЛЕ/ЛН. Представена е установената статистически значима разлика в серумните нива на IL-17A за TT генотипа спрямо останалите генотипи и за двете групи. Липсва статистическа значима разлика между болни и здрави лица.

В обобщение при сравнението на нивата на IL-17A по генотип в рамките на групата на пациентите подобно на резултатите при здрави лица, значими различия се установиха единствено по отношение на полиморфизма TGF-β -509C/T rs18000467. Подобно на резултатите при здрави лица и тук TGFβ -509TT генотипа се асоциира със значимо високи нива на IL-17A. И за трите изследвани полиморфизма не се установяват статистически различия в нивата на IL-17A при сравнение им по идентични генотипи между болни и здрави лица.

3. АСОЦИАТИВНО ПРОУЧВАНЕ НА ПОЛИМОРФИЗМИ, СВЪРЗАНИ СЪС СИГНАЛНИЯ ПЪТ НА IL-17A ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС СЛЕ И ЛН

В хода на настоящото проучване бе проведен анализ от вида случай - контрола за връзката на три единични нуклеотидни полиморфизма - rs2275913 *IL-17A* -197G/A, rs708567 *IL-17RC* +6313C/T, rs1800469 *TGF-β* -509C/T. Честотата на полиморфизмите в цитокиновите гени бе проучена в група от 59 болни със СЛЕ и ЛН и беше сравнена с тази на 95 здрави, неродствени индивиди. Всички изследвани SNPs са в съответствие със закона на Hardy-Weinberg. За всеки отделен полиморфизъм бе изследвано алелно и генотипно влияние върху клиничните признаци на болестта.

3.1. Влияние на *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 върху възприемчивостта и клиничните признаци при СЛЕ и ЛН.

Получените резултати относно генотипните и алелни честоти за *IL-17A* -197 G/A rs2275913 полиморфизма при пациентите със СЛЕ/ЛН и сред здравите лица са обобщени в таблица 4. Както се вижда разпределението по генотипи между пациентите и контролите не се различава. И в двете групи G алела се среща с по-висока честота в сравнение с A алела като разпределението в двете групи е почти идентично (69% спрямо 31%)

Таблица 4. Алелни и генотипни честоти на полиморфизма rs2275913 в гена *IL-17A* при пациентите със СЛЕ и здрави лица.

Ген полиморфизъм	Генотипи и алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	p-стойност (точен тест на Фишер)
			Пациенти СЛЕ/ЛН (59)	Контроли (95)			
<i>rs2275913</i> <i>IL-17A</i> -197 G/A	Генотипи	GG	27 (45.8)	43 (45.3)	1	0.5 – 1.9	1
		GA	28 (47.5)	45 (47.3)	1	0.5 – 1.9	1
		AA	4 (6.7)	7 (7.4)	0.9	0.3 – 3.3	1
	Алели	G	82 (69.5)	131 (68.9)	1	0.6–1.6	1
		A	36 (30.5)	59 (31.1)			

Алелно и генотипно влияние на *IL-17A (-197G/A) rs2275913* полиморфизма върху клиничните признаци при СЛЕ и ЛН

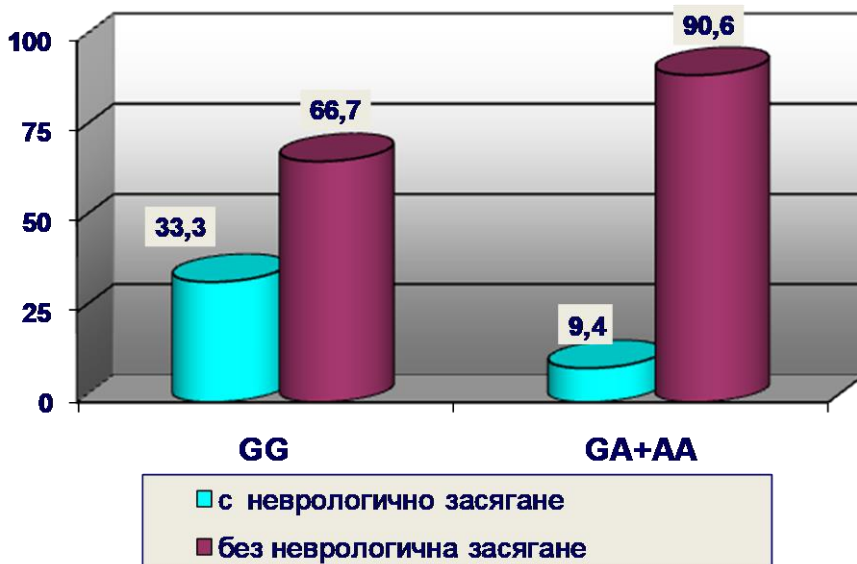
Връзката между изследвания полиморфизъм и клиничните признаци при СЛЕ и ЛН обобщено са представени в таблица 5. При проучването им бе установена единствено асоциация на носителството на *IL17A -197GG* генотипа ($p=0.028$, OR 4.83, 95% CI 1.2-20.3) и G-алела ($p=0.024$, OR 3.8, 95%CI 1-13.6) с наличието на неврологично засягане.

Таблица 5. Генотипно разпределение на *IL-17A (-197G/A) rs2275913* полиморфизма при СЛЕ/ЛН спрямо клиничните признаци при СЛЕ и ЛН.

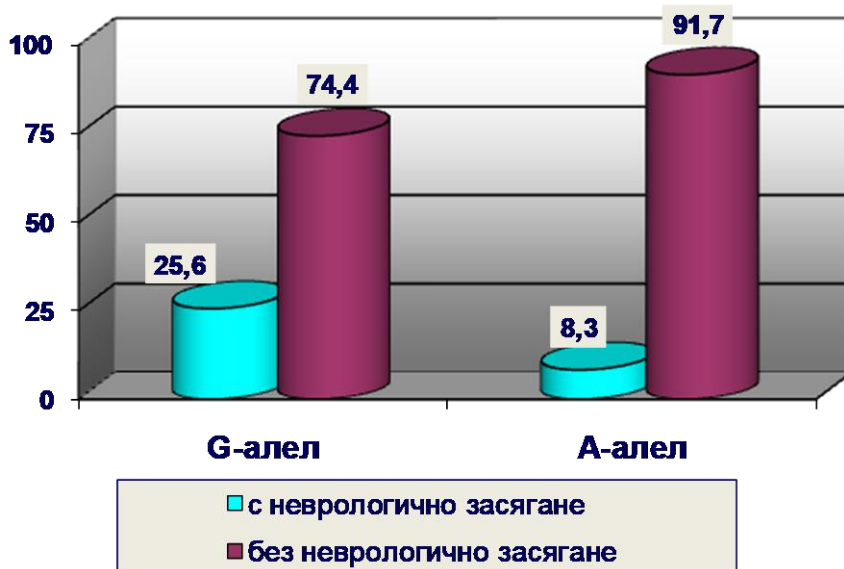
<i>Генотип</i>	<i>GG (n=27)</i>	<i>GA (n=28)</i>	<i>AA (n=4)</i>	<i>p-стойност</i>
<i>Клиничен признак</i>				<i>Fisher's exact test</i>
Малариен обрив	16 (59.3%)	16 (57.1%)	3 (75.0%)	NS*
Дискоиден обрив	5 (18.5%)	7 (25.0%)	0 (0.0%)	NS
Фоточувствителност	15 (55.6%)	15 (53.6%)	3 (75.0%)	NS
Афтоза	3 (11.1%)	1 (3.6%)	0 (0.0%)	NS
Артрит	17 (63.0%)	20 (71.4%)	3 (75.0%)	NS
Серозит	5 (18.5%)	7 (25.0%)	1 (25.0%)	NS
Бъбречно засягане	27(100.0%)	28 (100.0%)	4 (100.0%)	-
Неврологично засягане	9 (33.3%)	3 (10.7%)	0 (0.0%)	GG генотип p=0.028 G алел p=0.024
Хематологично засягане	7 (25.9%)	13 (46.4%)	3 (75.0%)	NS
АНА	24 (88.9%)	28 (100.0%)	2 (50.0%)	NS
Имунологично засягане (анти-двДНК, анти-Sm, АФА, други)	20 (74.1%)	20 (71.4%)	4 (100.0%)	NS

*NS- статистически незначим резултат

От направения анализ се установи рецесивен модел (GG/GA+AA) на влияние в *IL-17A (-197G/A) rs2275913* върху неврологичната симптоматика. На фигури 26 и 27 детайлно е представена асоциацията на -197GG генотипа и -197G алела с неврологичното засягане, като както беше отбелязано, носителството им е свързано съответно с 4.83 и 3.8 пъти по-голям риск за неврологична изява на болестта (виж OR по-горе)



Фигура 26. Рecessивен модел на влияние на полиморфизма *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 върху неврологичната симптоматика при пациенти със СЛЕ/ЛН. Представена е асоциацията на -197GG генотипа с неврологичното засягане при пациенти със СЛЕ.



Фигура 27. Асоциация на -197G алела от полиморфизма *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 с неврологичното засягане при пациенти със СЛЕ.

3.2. Влияние на *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 върху възприемчивостта и клиничните признаци при СЛЕ и ЛН.

Получените резултати относно генотипните и алелни честоти за *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 полиморфизма при пациентите със СЛЕ/ЛН и сред здравите лица са обобщени в таблица 6. Както се вижда от таблицата генотипното и алелно разпределение между пациентите и контролите не показва значими различия.

Таблица 6. Алелни и генотипни честоти на полиморфизма rs708567 в гена *IL-17RC* (+6313C/T) при пациентите със СЛЕ и здрави лица.

Ген полиморфизъм	Генотипи и Алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	p-стойност (точен тест на Фишер)
			СЛЕ /ЛН (59)	Контроли (95)			
<i>IL-17RC</i> <i>rs708567</i>	Генотипи	CC	17 (28.8)	21 (22.1)	1.00	0.9 – 4	0.1
		CT	24 (40.7)	43 (45.3)	0.08	0.4 – 1.6	0.6
		TT	18 (30.5)	31 (32.6)	0.9	0.4 – 1.6	0.9
	Алели	C	58 (49.2)	85 (44.7)	1.2	0.8 – 1.9	0.5
		T	60 (50.8)	105 (55.3)			

Алелно и генотипно влияние на *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 полиморфизма върху клиничните признаци при СЛЕ и ЛН

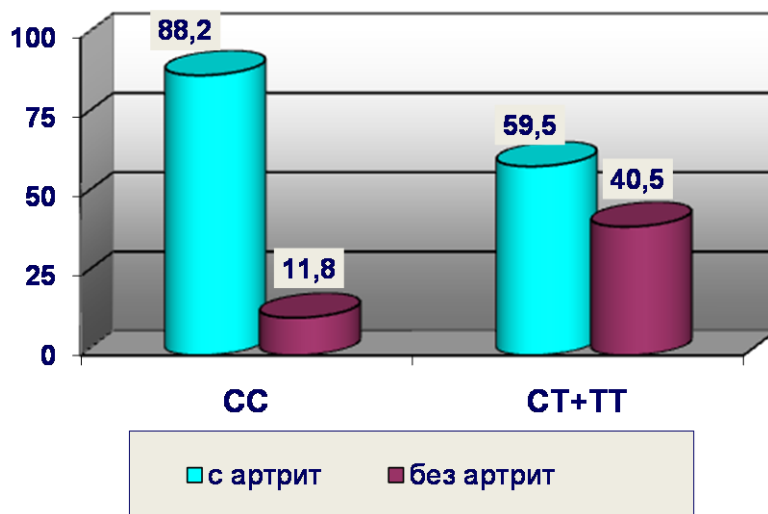
При проучването на връзката между изследвания полиморфизъм и клиничните признаци при СЛЕ и ЛН, бе установена единствено асоциация на носителството на *IL17RC* +6313CC генотипа (p=0.029, OR 5.1, 95% CI 1-25.2) и +6313C алела (p=0.017, OR 2.6, 95%CI 1.2-5.42;) с наличието на артрит. Обобщените данни са представени в таблица 7.

Таблица 7. Генотипно разпределение на *IL-17RC (+6313)C/T rs708567* полиморфизма при СЛЕ и ЛН спрямо клиничните признаци.

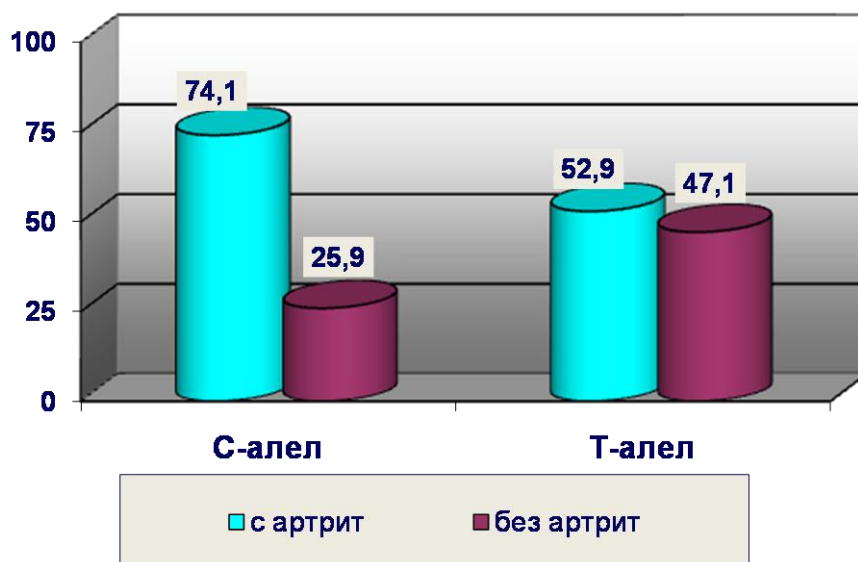
<i>Генотип</i>	<i>CC (n=17)</i>	<i>CT (n=24)</i>	<i>TT(n=18)</i>	<i>р-стойност</i>
<i>Клиничен признак</i>				<i>Fisher's exact test</i>
Малариен обрив	11 (64.7%)	13 (54.2%)	11 (61.1%)	NS*
Дискоиден обрив	3 (17.6%)	6 (25.0%)	3 (16.7%)	NS
Фоточувствителност	8 (47.1%)	13 (54.2%)	11 (61.1%)	NS
Афтоза	2 (11.8%)	2 (8.3%)	0 (0.0%)	NS
Артрит	15 (88.2%)	13 (54.2%)	12 (66.7%)	СС генотип р=0.029 С алел р=0.017
Серозит	6 (35.3%)	2 (8.3%)	5 (27.8%)	NS
Бъбречно засягане	17(100.0%)	24 (100.0%)	18(100.0%)	-
Неврологично засягане	4 (23.5%)	5 (20.8%)	3 (16.7%)	NS
Хематологично засягане	10 (58.8%)	7 (29.2%)	6 (33.3%)	0.07
АНА	16 (94.1%)	24 (100.0%)	16 (88.9%)	NS
Имунологично засягане (анти-двДНК, анти-Sm, АФА, други)	11 (64.7%)	20 (83.3%)	13 (72.2%)	NS

*NS- статистически незначим резултат

От направения анализ се установи рецесивен модел (СС/СТ+ТТ) на влияние в *IL-17A (-197G/A) rs2275913* върху изявата на артрит. На фигури 28 и 29 детайлно е представена асоциацията на +6313СС генотипа и +6313С алела с артрит. Както беше посочено, носителството на +6313С алела се свързва с 2.5 пъти по-висок риск от развитие на артрит, а при носителството на +6313СС генотипа, този риск при пациентите със СЛЕ е 5 пъти по-голям (виж OR по-горе).



Фигура 28. Рecessивен модел на влияние на полиморфизма *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 върху изявата на артрит при пациенти със СЛЕ/ЛН. Представена е асоциацията на +6313CC генотипа с артрит при пациенти със СЛЕ.



Фигура 29. Асоциация на +6313C алаела от полиморфизма *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 с артрит при пациенти със СЛЕ.

3.3. Влияние на *TGF-β (-509C/T) rs1800469* върху възприемчивостта и клиничните признаци при СЛЕ и ЛН.

От всички изследвани полиморфизми единствено *TGF-β (-509C/T)* полиморфизмът показва статистически значима разлика между групата на пациентите със СЛЕ/ЛН и контролната група. Наблюдаваните алелни и генотипни честоти при изследваните пациенти със СЛЕ/ЛН и здрави лица са представени в таблица 8. Установено беше, че честотата на -509ТТ генотипа сред пациентите със СЛЕ е по-висока (25.4%) в сравнение с контролите (14.7%), което се свързва с повишен риск от развитие на болестта от 1.8 пъти, без да се достига до статистическа значимост (OR 1.8; 95%CI 0.8-4.1; p=0.19). Направеният анализ показва, че -509Т-алелът от *TGF-β rs1800469* се среща със значимо по-висока честота (p=0.04) сред пациентите със СЛЕ и ЛН (49.2%) в сравнение със здравите лица (38.4%). Наличието на високопродуциращият -509Т алел самостоятелно води до 1.5 пъти по-висок риск за развитие на лупусен нефрит и показва статистически значима асоциация със заболяването (OR 1.5, 95%CI 1-2.5; p=0.04) (табл. 8)

Таблица 8. Алелни и генотипни честоти на полиморфизма *rs1800469* в гена *TGF-β (-509C/T)* при пациентите със СЛЕ и здрави лица.

Ген полиморфизъм	Генотипи и Алели		Група, брой (%)		OR	95% CI	p-стойност (точен тест на Фишер)
			СЛЕ/ЛН (59)	Контроли (95)			
<i>TGF-β rs1800469</i>	Генотипи	CC	16 (27.1)	36 (37.9)	0.6	0.3 – 1.2	0.2
		CT	28 (47.5)	45 (47.4)	1	1 – 2.1	1
		TT	15 (25.4)	14 (14.7)	1.8	0.8 – 4.1	0.19
	Алели	C	60 (50.8)	117 (61.6)	1.5	1 – 2.5	0.04
		T	58 (49.2)	73 (38.4)			

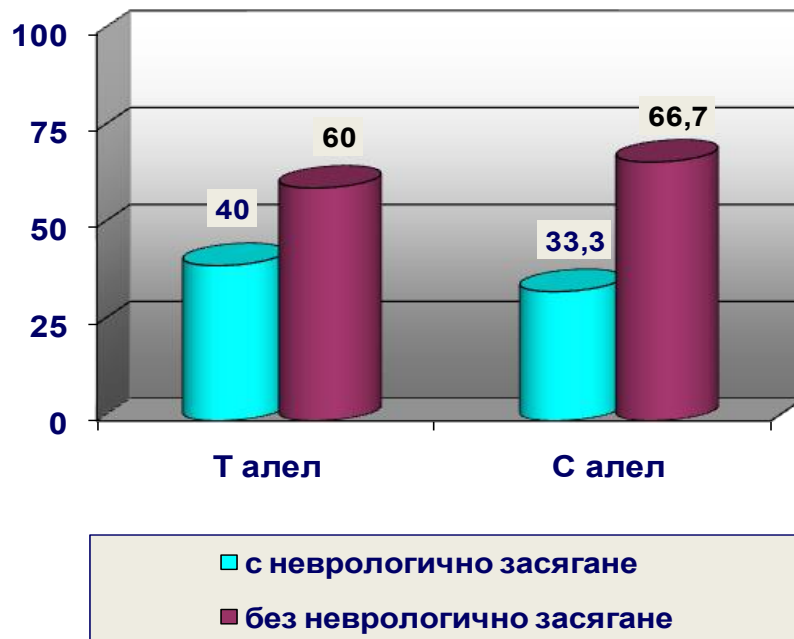
Алелно и генотипно влияние на *TGF-β* (-509C/T) rs1800469 полиморфизма върху клиничните признаци при СЛЕ и ЛН

Резултатите от анализа на полиморфизма *TGF-β* (-509C/T) rs1800469 за клиничните прояви при СЛЕ/ЛН са обобщени в таблица 9. Статистически значима асоциация беше установена единствено между Т-алела (p=0.04, OR 2.5, 95%CI 1-6.4;) и наличието на неврологично засягане (фигура 30).

Таблица 9. Генотипно разпределение на *TGF-β* (-509C/T) rs1800469 полиморфизма при СЛЕ и ЛН спрямо клиничните признаци.

<i>Генотип</i>	<i>CC (n=16)</i>	<i>CT (n=28)</i>	<i>TT(n=15)</i>	<i>р-стойност</i>
<i>Клиничен признак</i>				<i>Fisher's exact test</i>
Малариен обрив	10 (62.5%)	17 (60.7%)	8 (53.3%)	NS*
Дискоиден обрив	3 (18.8%)	5 (17.9%)	4 (26.7%)	NS
Фоточувствителност	15 (55.6%)	15 (53.6%)	3 (75.0%)	NS
Афтоза	2 (12.5%)	0 (0.0%)	2 (13.3%)	NS
Артрит	12 (75.0%)	19 (67.9%)	9 (60.0%)	NS
Серозит	3 (18.8%)	6 (21.4%)	4 (26.7%)	NS
Бъбречно засягане	16 (100.0%)	28 (100.0%)	15 (100.0%)	-
Неврологично засягане	2 (12.5%)	4 (14.3%)	6 (40.0%)	Т алел p=0.04
Хематологично засягане	7 (43.8%)	12 (42.9%)	4 (26.7%)	NS
АНА	16 (100.0%)	26 (92.9%)	14 (93.3%)	0.05
Имунологично засягане (анти-двДНК, анти-Sm, АФА, други)	14 (87.5%)	21 (75.0%)	9 (60.0%)	NS

*NS- статистически незначим резултат



Фигура 30. Асоциация на -509Т алела от полиморфизма *TGF- β* (-509С/Т) rs1800469 с неврологичното засягане при пациенти със СЛЕ.

ОБСЪЖДАНЕ

Настоящата работа е насочена към изясняване на ролята на сигналния път на Th17/IL-17A/IL17R за развитието на СЛЕ и ЛН, като се изследва ролята на полиморфизми в цитокиновите гени върху протеиновата продукция, предразположението и протичането на болестта.

1. СЕРУМНИ НИВА НА ИНТЕРЛЕВКИН - 17А (IL-17A) - РОЛЯ В ПАТОГЕНЕЗАТА НА СЛЕ И ЛН

Предполага се, че Th17 клетките и техните ефекторни цитокини като IL-17A и IL-17F биха могли да играят важна роля за възприемчивостта към СЛЕ, протичането на заболяването и неговото лечение, но все още данните в литературата не са еднозначни. Настоящото проучване е първото, което изследва нивата на IL-17A сред пациенти със СЛЕ и ЛН в българската популация. Много автори съобщават за повишени нива на IL-17A сред пациентите със СЛЕ и ЛН [1-3], но има и немалко проучвания, които не доказват подобна връзка [4,5]. Ето защо настоящата работа има за цел да оцени значението на серумните нива на IL-17A за развитието на СЛЕ и ЛН и активността на заболяването сред българската популация. Въпреки установената по-висока средна на IL-17A в абсолютна стойност в групата на СЛЕ/ЛН в сравнение с контролите, поради асиметричното разпределение, беше използван непараметричен U тест на Mann Whitney, който показва, че разликите в медианите не достигат статистическа значимост. Този резултат на пръв поглед подкрепя становището, че IL-17A не участва в патогенезата на СЛЕ и ЛН, но установената положителна корелация между цитокиновите нива и индекса за активност на заболяването (SLEDAI-2K), посочват необходимостта от по-задълбочен анализ и търсене на възможни причини, които да обяснят

получените различия в литературата. Наблюдаваните разнопосочни резултати биха могли да се дължат на разликите в използваните класификационни критерии при подбора на пациентите, активността на заболяването, броят включени лица и съответно силата на статистическия анализ, както и използваната методика за определяне на нивата на IL-17A. Сравнителен анализ между нашите резултати и други проучвания е представен в таблица 10.

Таблица 10. Сравнение на серумните концентрации на IL-17A при СЛЕ сред различни популационни групи

Референция	Популация	Брой пациенти/ контроли	Концентрация IL-17A СЛЕ	Концентрация IL-17A контроли	Метод	p
Настоящо проучване	България	59/95	7.24	5.76	ELISA	NS*
Wong и сътр. 2008[7]	Китай	80/40	23.51	6.55	ELISA	<0.001
Zhao X и сътр. 2010 [3]	Китай	57/30	23.55	16.98	ELISA	<0.001
Мак и сътр. 2013[8]	Сингапур	54/54	6.15	9.51	IA**	NS
Zhao и сътр. 2013[9]	Китай	22/18	63	60	ELISA	<0.05
Ballantine и сътр. 2014[10]	Обединено кралство	19/18	21.5	7.2	ELISA	<0.05
Boghdadi & Eleva 2014 [11]	Египет	40/30	37	6.75	ELISA	<0.001
Shahin и сътр. 2016	Египет	57/42	48	24.6	ELISA	<0.001
Schmitz и сътр. 2015[12]	Бразилия	17/17	5.7	1.3	ELISA	NS
Cavalcanti и сътр. 2017	Бразилия	51/47	4.93	4.04	ELISA	NS
Raymond и сътр. 2017[4]	Австралия	102/31	28.4	28.4	IA	NS
Jin и сътр. 2018[13]	Китай	55/55	4.67	4.13	ELISA	<0.05
Zecovic и сътр. 2018	Сърбия	55/25	49	28	ELISA	<0.05
Chaharom и сътр. 2023 [14]	Иран	36/40	536	110	ELISA	<0.001

NS* = несигнификантно **IA = Immunoassay

Както се вижда от таблица 8, серумните нива на IL-17A варират в широки граници при различните проучвания. Получените в настоящата работа резултати със средни стойности за нивата на IL-17A от 7.24 pg/mL в групата на СЛЕ/ЛН и 5.76 pg/mL при контролите са много сходни с данните на A. Cavalcanti и сътр. и Schmitz и сътр. сред бразилската популация, както и Jin и сътр. сред китайската, независимо от използваната методика. Вероятно обяснение за липсата на статистически значимост в настоящото проучване е, че голяма част от пациентите провеждат лечение (вкл. 39% на поддържаща терапия) и имат ниска болестна активност (средна за SLEDAI-2K от 9.9 за цялата група), както и необходимост от използването на непараметричен статистически метод за оценка поради неправилното разпределение на променливата.

Резултатите относно връзката между нивата на IL-17A и клиничните признаци на СЛЕ са още по-хетерогенни и силно варират в отделните проучвания (таблица 11). Така например F. Vincent и сътр. намират асоциация между високите нива на IL-17A и неврологичната изява на болестта [15]. За разлика от тях, въпреки че намират значима разлика относно нивата на IL-17A между пациенти със СЛЕ и здрави лица, X. Zhao и сътр. не установяват връзка между нивата на IL-17A и клиничните и лабораторни параметри при СЛЕ, включително и по отношение на ЛН, подобно на нашите резултати [3].

Таблица 11. Серумни нива на IL-17A - връзка със СЛЕ и ЛН, клинично-лабораторни асоциации

Референция	Популация	Брой Пациенти контроли	Асоциация на IL-17A със СЛЕ	Асоциация на IL-17A със ЛН	Клинични асоциации на IL-17A при СЛЕ
Настоящо проучване	българи	59/95	липсва	липсва	Протеинурия
Vincenti сътр. 2013[15]	азиатци + бяла раса	39+57/39	-	липсва	Неврологично засягане
Zhao и сътр. 2010[3]	китайци	57/30	да	липсва	липсва
Nordin и сътр. 2019 [16]	малайзийци	120/-	-	да	Хематологичен скор по BILAG
Mostafa и сътр. 2022[17]	египтяни	60/60	да	липсва	Протеинурия, анти-двДНК
Shaharom и сътр. 2023[14]	иранци	36/40	да	да	Неврологично засягане

Подобно на нашите резултати, J. Reynolds и сътр. също не установяват статистически значима разлика между нивата на IL-17A сред здрави лица и пациенти със СЛЕ [18]. Когато обаче, под внимание се вземе активността на заболяването, техният екип, както и повечето автори се обединяват около становището, че IL-17A се асоциира с активните форми на заболяването, в това число и с активен лупусен нефрит [5, 19, 20]. Получените от нас резултати за установената положителна корелация между серумните нива на IL-17A и индекса за активност на заболяването SLEDAI-2K са в пълен унисон с тези данни и подкрепят тезата, че IL-17A може да бъде използван като маркер за мониторинг на активността на заболяването. Има автори, които установяват значима връзка между нивата на IL-17A и протеинурията [21, 22], което се потвърждава и от установената от нас положителна корелация между тези два параметъра. Макар и индиректно, установената корелация би могла да бъде белег за неблагоприятното влияние на IL-17A върху подоцитите при ЛН, подобно на това описано при мембранозна нефропатия. От друга страна връзката с протеинурията може да се дължи и на стимулираната от IL-17A ендокapилярна пролиферация. Chen и сътр. отчитат сигнификантно по-високи нива на IL-17A при пролиферативните III и IV клас лупусен нефрит, което съвпада напълно с резултатите от настоящото проучване. Така нашите данни подкрепят становището на A. Zickert и сътр. [19] и Larosa и сътр. [23], че високите нива на IL-17 се свързват с неблагоприятен хистологичен тип и биха могли да бъде маркер за тежестта на ЛН. Установените от нас по-ниски нива на IL-17 при клас V, вероятно се дължат на провежданата индукционна терапия, тъй като подетайлен анализ в групата на пациентите с ЛН клас V, показва, че при голяма част от тях (66%) е провеждана индукционна терапия по време на изследването. Така ниските нива на IL-17 биха могли да отразяват отговора към лечение, но малкият брой пациенти не позволи да бъде проведен достоверен статистически анализ, за да се провери хипотезата

на J. Thurman и сътр. [24] и J. Santacruz и сътр. [25], които считат, че IL-17 би могъл да бъде комплексен биомаркер за диагностика, мониторинг, оценка на активността и предикация относно отговора на лечение при ЛН.

2. ГЕНОТИПНО ВЛИЯНИЕ НА ЕДИНИЧНИТЕ НУКЛЕОТИДНИ ПОЛИМОРФИЗМИ ВЪРХУ ПРОДУКЦИЯТА НА IL-17A ПРИ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ЗДРАВИ И БОЛНИ ЛИЦА

2.1. Роля на *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 полиморфизма върху нивата на IL-17A

Ролята на *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 полиморфизма върху нивата на IL-17A също е обект на дискусия. Едно проучване показва, че носителите на мутантния А алел имат по-ниски нива на IL-17A [26]. От друга страна *in vitro* стимулирани Т клетки от здрави доброволци, носители на -197А алела показват значително по-висока продукция на IL-17A в сравнение с тези, при които този алел липсва [27]. Подобно на нашите резултати, две други проучвания не установяват влияние на *IL-17A* rs2275913 полиморфизма върху плазмените нива на IL-17A сред пациенти със СЛЕ и ревматоиден артрит [15, 28]. Получените резултати в настоящото проучване за липса на значимо влияние на полиморфизма *IL-17A* rs2275913 върху секрецията на IL-17A при здрави лица определя необходимостта от търсене на други функционално активни фактори, имащи отношение към протеиновата продукция, включително епигенетични влияния. Липсата на значими различия в IL-17A по генотип в групата на СЛЕ, както и при сравнението със здрави лица, показва, че в условията на болестния процес *IL-17A* rs2275913 полиморфизмът не променя своята функционалност и не води до патологична изменения в секрецията на IL-17A.

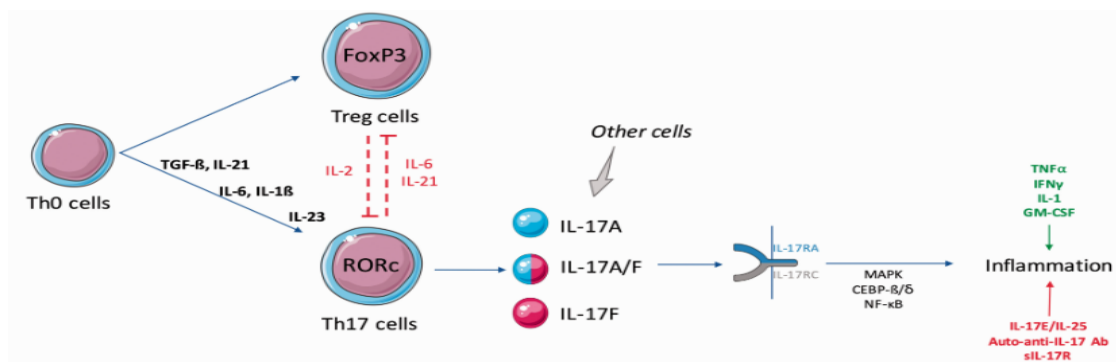
2.2. Роля на *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 полиморфизма върху нивата на IL-17A

Установено е, че полиморфизмът rs708567 C/T в гена *IL-17RC* представлява мисенс (missense) мутация, за която се предполага, че играе важна роля в дисфункцията на рецептора [26]. Дали този процес стимулира или потиска секрецията на IL-17A по пътя на обратната връзка, засега остава неизяснен въпрос. С оглед неимунологичните свойства на IL-17 фамилията, първоначалната насока на изследване е свързана с костния метаболизъм. Т. Dhaouadi и сътр. за първи път изследват влиянието на този полиморфизъм върху нивата на IL-17A при пациенти с ревматоиден артрит, но не потвърждават значението му [27]. При пациенти с анкилозиращ сподилит също не се установява връзка между полиморфизма rs708567 и нивата на IL-17A [28]. Нашите резултати са първите в световен мащаб, които изследват влиянието на този полиморфизъм върху нивата на IL-17A при пациенти със СЛЕ и ЛН. Подобно на посочените две проучвания настоящата работа също не потвърждава функционалната значимост и роля на полиморфизма за секрецията на IL-17A, както при здрави лица, така и в патологични условия при пациенти със СЛЕ и ЛН.

2.3. Роля на *TGF-β* (-509C/T) rs1800469 полиморфизма върху нивата на IL-17A

Повечето съвременни проучвания подкрепят значението на TGF-β за началния етап на Th17 клетъчната диференциация [29, 30]. Тъй като има данни, че TGF-β -509C/T (rs1800469) полиморфизмът има функционално значение за продукцията на TGF-β и респективно диференциацията на Th17, този полиморфизъм също попадна във фокуса на настоящото проучване, за да се оцени ролята му в сигналния път на

IL-17. Нашите данни индиректно също потвърждават връзката между TGF- β и оста Th17/IL-17A/IL17-RC. При изследването на TGF- β rs1800469 полиморфизма, ние установихме, че TT генотипът, който по литературни данни се свързва с по-високи нива на TGF- β , се асоциира и с по-високи нива на IL-17A. Според повечето автори причината -509T алелът да се асоциира с повишени нива на TGF- β е, че той предотвратява свързването на супресорния транскрипционен фактор AP1 в промоторния регион [31]. Повишените нива на TGF- β стимулират прекурсорите в посока на диференциация към Th17 (за сметка на Treg) и съответно към производството на характерния за тази популация клетки цитокин - IL-17A (фигура 31.)



Фигура 31. Схематично представяне на етапите от сигналния път Th17/IL-17/IL17R по M. Robert и P. Miossec. [32]

По този механизъм TGF- β (-509C/T) rs1800469 полиморфизмът би могъл да оказва влияние върху серумните нива на IL-17A и развитието на автоимунния процес. Предвид установената от нас значима връзка между -509T алела и лупусния нефрит, би могло да се предполага, че алелът осъществява своя патологичен ефект именно чрез влияние върху цитокиновата мрежа включително и върху серумните нива на IL-17A.

3. АЛЕЛНА И ГЕНОТИПНА ЧЕСТОТА НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ СРЕД БЪЛГАРСКАТА ПОПУЛАЦИЯ

Практическото значение на популационни честоти се свързва с определяне на възможността на полиморфните алели да оказват влияние върху унаследяването на полигенните заболявания, както и да се обяснят популационните различия, които често се наблюдават в генетичните асоциативни проучвания. Всички изследвани в настоящата работа полиморфизми показват честота над 5% сред българската популация, което показва теоретичен потенциал да участват в патологични процеси. В настоящото проучване за пръв път се изследва честотата на *IL-17A* (-197G/A) *rs2275913* и *IL-17RC* (+6313C/T) *rs708567* полиморфизмите сред българи.

Установената от нас алелна честота от 68.9% за G алела спрямо 31.1% за A алела в *IL-17A* (-197G/A) *rs2275913* полиморфизма, съответства на тази посочена в базата данни на dbGaP (NCBI ALFA) www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2275913 сред европейци. Кумулативният брой на изследваните лица от европейски произход е 89 42, като получените алелни честоти са съответно 65.1% за G алела спрямо 34.9% за A алела. Почти напълно сходни с нашите данни са и резултатите от проучването на и R. Lopez Mejias и сътр. върху кавказката популация, които установяват алелна честота от 66.8% за G алела и 33.2% за A алела. Друг български екип през 2022 г. също изследва този полиморфизъм в насока колоректален карцином [33]. Данните за контролната група показват сходни с нашите резултати, като се наблюдава по-висока честота на -197A алела и -197AA генотипа. Това различие може да се дължи отчасти и на използваната методика. За разлика от проучването на Александрова и сътр., които използват RFLP, в настоящото проучване е използван автоматизиран TaqMan анализ. В проучване в суданската популация (с преобладаващ арабски етнос) се установява, значимо по-висока честота

на А алела - 64.7 спрямо 35.3 за G алела. Обратно сред афроамериканците и латиноамериканци се наблюдава значимо по-висока честота на -197G алела до 90.8% за афроамериканците и 76.9%-78.2 за латиноамериканците. Алелните и генотипни популационни честоти за полиморфизма *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 са систематизирани в таблица 12.

Таблица 12. Алелни и генотипни популационни честоти за полиморфизма *IL-17A* (-197G/A) rs2275913

Референция	Популация	Брой изследвани здрави лица	Алелна честота <i>IL-17A</i> rs2275913		Генотипна честота <i>IL-17A</i> rs2275913		
			-197G	-197A	GG	GA	AA
Настоящо проучване	българи	95	65.1	34.9	45.3	47.3	7.4
Nordang и сътр. 2009[34]	норвежци	899	74.0	26.0	55.0	38.0	7.0
Mohammadipour сътр. 2019 [35]	иранци	200	69.5	30.5	48.5	42	9.5
Pashai сътр. 2019[36]	египтяни	80	69.4	30.6	50.0	38.7	11.3
Lopez Mejias и сътр. 2020 [37]	кавказка раса	1003	66.8	33.2	44.8	44.2	11.1
Zhang и сътр. 2020[38]	китайци	312	61.7	38.3	37.8	47.8	14.4
Mohamed и сътр. 2020 [39]	судански арабски етнос	418	35.3	64.7	4.5	61.4	34.0
Lopez Mejias и сътр. 2020 [37]	кавказка раса	1003	66.8	33.2	44.8	44.2	11.1
Mazurek-Mochol и сътр. 2021 [40]	поляци	159	62.3	37.7	40.3	44.0	15.7
Rushdui сътр. 2022 [41]	египтяни	17	68.8	31.2	43.8	50.0	6.3
Александрова и сътр. 2022 [33]	българи	106	61.0	39.0	34.0	55.0	11.1

Получените от нас резултати относно алелната честота на *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 от 55.3% за T алела спрямо 44.7% за C алела отново съответстват напълно с тази, посочена в базата данни на dbGaP (NCBI ALFA) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs708567>. При изследваните 101102 лица от европейски произход, 54.0% са носители на T алела спрямо 46.0% за C алела, за разлика от мономорфната изява на полиморфизма *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 сред китайци от популацията

Нап и азиатските етноси, където значимо преобладава С алелът. Резултатите от настоящото проучване показват, че сред българи той е полиморфен, като установената от нас алелна честота, е най-сходна с резултатите, получени в полската популация (таблица 13). Така представените данни очертават наличието на значими популационни различия.

Таблица 13. Алелни и генотипни популационни честоти за полиморфизма *IL-17RC (+6313C/T) rs708567*

Референция	Популация	Брой изследвани здрави лица	Алелна честота на <i>IL-17RC rs708567</i>		Генотипна честота на <i>IL-17RC rs708567</i>		
			+6313C	+6313T	CC	CT	TT
Настоящо проучване	българи	95	44.7	55.3	22.1	45.3	32.6
Zhou и сътр. 2012 [26]	китайци	512	92.8	7.2	85.6	14.4	0
Dhaouadi и сътр. 2018 [33]	тунизийци	106	61.0	39.0	37.4	50.5	12.1
Wielinska и сътр. 2021 [28]	поляци	189	45.8	54.2	58.7	45.8	24.9

Полиморфизмът *TGF-β (-509C/T) rs1800469* е изследван от няколко български екипа в различни насоки - първите му проучвания са в контекста на идиопатична адолесцентна сколиоза [42] и колоректален карцином [43], а впоследствие и при ревматоиден артрит [44] (таблица 14). Нашите резултати относно популационната алелна и генотипна честота на този полиморфизъм сред здрави лица напълно съвпадат с данните на Г. Василев и сътр. [44], които използват методика описана от С. Станилова и сътр. от 2018 г. [43] (таблица 14). Различията в резултатите между отделните проучвания биха могли да се обяснят с хетерогенността на българската популация, както и с индивидуалните особености на изследваните лица. Данните от настоящото проучване за алелната честота на този полиморфизъм в най-голяма степен се доближават до кумулативните данни за 239138 лица от европейската

популация, където се съобщава за алелна честота от 67.7 % за С алела към 32.3% за Т алела (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1800469>).

Таблица 14. Алелна и генотипна честота за полиморфизма *TGF-β* (-509C/T) rs1800469 сред българската популация.

Референция	Популация	Брой изследвани здрави лица	Алелна честота <i>TGF-β</i> rs1800469		Генотипна честота <i>TGF-β</i> rs1800469		
			-509C	-509T	CC	CT	TT
Настоящо проучване	българи	95	61.6	38.4	37.9	47.4	14.7
Станилова и сътр. 2018 [43]	българи	210	55.0	45.0	31.0	46.0	22.1
Николова и сътр. 2018 [42]	българи	254	57.0	43.0	18.1	49.6	32.3
Василев и сътр. 2022 [44]	българи	155	61.0	39.0	35.5	50.3	14.2

4. ВЛИЯНИЕ НА НУКЛЕОТИДНИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ ВЪРХУ ВЪЗПРИЕМЧИВОСТТА И КЛИНИЧНОТО ПРОТИЧАНЕ НА СИСТЕМНИЯ ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС И ЛУПУСНИЯ НЕФРИТ

4.1. Влияние на *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 върху възприемчивостта и клиничните признаци при СЛЕ и ЛН.

От всички SNPs в *IL-17A* гена най-голяма дискусия предизвиква -197G/A полиморфизмът. Както беше посочено, проведените асоциативни проучвания, касаещи участието на този полиморфизъм в патогенезата на аутоимунните заболявания, водят до разделение в мненията на изследвателските екипи. Наскоро излязъл метаанализ показва асоциация между *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 полиморфизма и СЛЕ, според който болестта се среща значително по-често при носителите на АА генотипа спрямо GG генотипа и комбинацията GG+GA [45]. Въпреки това данните от анализа показват, че А алелът самостоятелно не може да бъде

рисков фактор за развитие на СЛЕ [45]. Сред иранската популация хетерозиготите (AG) показват тенденция към развитие на болестта, а носителството на А алела се определя като рисков за развитие на СЛЕ [46]. Обратно други автори изказват мнение, че *IL-17A* G алела и GG генотипа биха могли да оказват патологичен ефект като допринасят за развитието на СЛЕ като част от комплексни генотипи - rs2275913GG/rs763780AG/rs2397084A или хаплотипи - rs2275913G/rs763780G/rs2397084A [47] и rs8193036T/rs3819024A/rs2275913G/rs8193037A [48].

От друга страна, също наскоро излязъл метаанализ, не установява връзка между посочения полиморфизъм и развитието на СЛЕ [49], което съвпада и с нашите данни.

Предвид разнопосочните данни и хетерогенността на самото заболяване с различните му форми, в настоящото проучване е направен опит за изследване на по-хомогенна група, като всички изследвани пациенти са с доказан ЛН. Данните в тази насока в световната литература са доста оскъдни. Проучванията по темата са систематизирани в таблица 15. Две от проучванията обхващат пациенти с ювенилен ЛН в египетската популация, при което се установява асоциация с А алела и АА генотипа [36, 50]. В три други проучвания, проведени сред мексиканци, индонезийци и отново сред египетски пациенти с ювенилен СЛЕ не се установява сигнификантна разлика в разпределението на алелните и генотипни честоти между пациенти с ЛН и контролната група [51]. Подобно на тези проучвания, получените от нас резултати не потвърждават ролята на *IL-17A* (-197G/A) полиморфизма за развитието на ЛН сред българската популация. Едно от проучванията изследва връзката на полиморфизма с класа бъбречно засягане, като не доказва неговото значение за тежестта на протичане на заболяването [51]. Друго от проучванията е насочено към изследване на връзката на полиморфизма с индексите на активност и хроничност и общата преживяемост.

При него също не се установяват асоциации между изброените показатели и полиморфизма [52].

Относно останалите клиничко-лабораторни прояви на СЛЕ, повечето автори не откриват връзка между полиморфизма и другите клинични признаци на болестта (таблица 15), с изключение на Pasha и сътр., които установяват връзка на -197AA генотипа с кожнолигавично и хематологично засягане. Ние установихме, че в българската популация -197GG генотипът, както и -197G алелът самостоятелно, са рискови фактори за развитието на неврологична симптоматика.

Таблица 15. Асоциация на *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 полиморфизма със СЛЕ, ЛН и клиничните прояви на болестта сред различни популационни групи.

Референция	Популация	Брой пациенти/ контроли	Асоциация със СЛЕ	Асоциация със ЛН	Асоциация с други клинични прояви на болестта
Настоящо проучване	българи	59/95	липсва	липсва	-197GG и -197G с неврологично засягане
Gunawan и сътр. 2016 [51]	индонезийци	30/20	липсва	липсва	липсва
Hammad и сътр. 2015 [52]	египтяни	115/259	липсва с ювенилен	липсва	липсва
Pasha и сътр. 2019 [36]	египтяни	80/80	-197A	-197AA	-197AA с кожнолигавично и хематологично засягане
Elkoumi и сътр. 2020 [50]	египтяни	320/320	-197AA и -197A с ювенилен СЛЕ	-197AA и -197A	липсва
Montufar Robles и сътр. 2018 [48]	мексиканци	268/351	липсва	липсва	не се съобщава
Sharifzadeh и сътр. 2018 [46]	иранци	102/141	-197A със СЛЕ	не се съобщава	не се съобщава

4.2 Влияние на *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 върху възприемчивостта и клиничните признаци при СЛЕ и ЛН

Сигналната трансдукция на IL-17A изисква присъствието на хетеродимерни рецептори от А и С рецепторните субединици. Тъй като нови данни показват значима роля на С рецепторната субединица при имуномедиирани бъбречни заболявания [53], а тя досега не е изследвана при СЛЕ и лупусен нефрит, същата е обект на настоящото проучване. Установено е, че полиморфизмът *IL-17RC* rs708567 се асоциира с ювенилната идиопатична сколиоза. Едва наскоро започна проучването му в насока унаследяване и развитие на автоимунни заболявания с проучването на Т. Dhaoudi и сътр. [27]. Макар да не откриваме асоциации на *IL-17RC* rs708567 полиморфизма със СЛЕ и ЛН по подобие на резултатите на Dhaoudi и сътр. за ревматоиден артрит, нашият екип е първият, който изяснява ролята на полиморфизма за развитието на СЛЕ и ЛН в световен мащаб. Проучванията върху ролята му за развитието на автоимунните заболявания продължават. В тази насока са и разработките на J. Wielinska и сътр., които установяват, че при анкилозиращ спондилит хомозиготите по Т алела (представени в статията, като идентичния AA генотип) имат по-ранно начало на заболяването [28].

Данните в литературата сочат, че мРНК на *IL-17RC* mRNA е силно експресирана в ставите [54], което може да даде обяснение защо наблюдаваме асоциация на *IL-17RC* +6313C алела и +6313CC генотипа с лупусния артрит. Тези наши резултати съответстват и на други проучвания, които показват връзка на същия полиморфизъм с клинично-лабораторни прояви при ревматоиден артрит [55].

4.3. Влияние на *TGF-β* (-509C/T) rs1800469 C/T върху възприемчивостта и клиничните признаци при СЛЕ и ЛН.

Асоциативното проучване върху *TGF-β* (-509C/T) rs1800469 показва, че Т алелът, асоцииран с високите нива на IL-17A, е рисков фактор и за

развитието на лупусен нефрит сред българската популация. Тези наши данни съответстват напълно с данните, получени сред други славянски народи [56]. Наред с установената асоциацията на -509ТТ генотипа и -509Т алела със СЛЕ в полската популация, Paradowska-Gorycka и сътр. описват и връзка на полиморфизма с нивата на хемоглобина, С-реактивния протеин (CRP), активираното парциално тромбoplastиново време (aPTT), INR и наличието на анти-Ro и анти-Sm антитела. На базата на тези данни авторите заключават, че *TGF-β* (-509C/T) rs1800469 полиморфизмът може да бъде използван като генетичен маркер за СЛЕ, което се потвърждава и от нашите данни. Засега механизмът, по който *TGF-β* (-509C/T) rs1800469 полиморфизмът оказва своя патологичен ефект остава неясен, но получените от нас данни сочат, че е възможно той да се дължи на индиректното му влияние върху серумните нива на IL-17A посредством продукцията на *TGF-β* и значението му за ранните етапи на Th17 диференциацията.

Установихме, че *TGF-β* (-509C/T) rs1800469 полиморфизмът модулира значимо и неврологичната изява на болестта в българската популация, като -509Т алелът е рисков за развитието на неврологична симптоматика. Възможно е тези наблюдения да се дължат на описаната връзка между -509Т алела и повишения сърдечносъдов риск [57]. Известно е, че голяма част от неврологичните промени при СЛЕ имат съдова генеза [58].

Няколко причини могат да се изтъкнат относно наблюдаваните различия в отделните проучвания, касаещи едни и същи полиморфизми. Едно от ограниченията на повечето проучвания, включително и настоящото, е относително малкият брой пациенти. Друга причина за разликата в резултатите е хетерогенността на изследваните популации и техния генетичен фонд, както и разнообразието в клиничното протичане на заболяването. В този контекст настоящата работа спомага за идентифицирането на подгрупи от пациенти със СЛЕ и ЛН и нарушения в

IL-17 оста, което би могло да спомогне за селектирането на "подходящи" пациенти за лечение с анти-IL-17 медикаменти.

Получените от нас резултати относно връзката между *TGF- β* (-509C/T) rs1800469 и серумните нива на IL-17A, обаче дават и нова насока за изследвания и анализ на кръстосаните взаимодействия на цитокините, следствие от различни цитокинови генни полиморфизми. Те биха могли да дадат отговор на въпроса защо протеиновата продукция на даден цитокин невинаги може да бъде използвана като предикативен маркер на отговор към терапия, както и да обяснят защо цитокини, които на пръв поглед нямат отношение към провежданото биологично лечение, могат да корелират с отговора на терапия. Предвид многобройните алелни варианти са необходими допълнителни проучвания и вероятно разработването на софтуерни платформи за анализ на получените база данни.

ОБОБЩЕНИЕ

В настоящата работа бяха проведени изследвания в три насоки: 1. определяне ролята на серумните нива на IL-17A в патогенезата на СЛЕ и ЛН. 2. определяне на значението на нуклеотидните полиморфизми от сигналния път на IL-17 (rs2275913, rs708567 и rs1800469) за секрецията на IL-17A и 3. определяне ролята на посочените полиморфизми за възприемчивостта и клиничното протичане на СЛЕ и ЛН.

В настоящата работа за пръв път в България бяха проучени серумните нива на IL-17A сред пациенти със СЛЕ и ЛН, при което се установи корелация между този цитокин, индекса за активност на заболяването SLEDAI-2K, протеинурията, както и асоциация с пролиферативните класове ЛН. Практическата стойност на получените резултати се свързва с възможността IL-17A да служи като допълнителен неинвазивен маркер за мониторинг на активността на заболяването и тежестта на лупусния нефрит.

От изследваните нуклеотидните полиморфизми от сигналния път на IL-17 (rs2275913, rs708567 и rs1800469), единствено *TGF-β* (-509C/T) rs1800469 показва асоциация със серумните нива на IL-17A. Установено беше, че -509 TT генотипът, който по литературни данни се свързва с по-високи нива на *TGF-β*, се асоциира и с по-високи нива на IL-17A. Вероятната причина за наблюдаваната асоциация е влиянието на *TGF-β* върху ранните етапи на Th17 клетъчна диференциация. Предвид установената от нас сигнификантна връзка между -509T алела и лупусния нефрит, би могло да се предполага, че алелът осъществява своя патологичен ефект именно чрез влияние върху цитокиновата мрежа, включително върху серумните нива на IL-17A.

Асоциативното проучване върху *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 и *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 не показва асоциация с възприемчивостта към СЛЕ и ЛН, но се установи, че и двата полиморфизма модулират клиничната изява на болестта. *IL-17A* -197G алелът и GG генотипът

преобладават сред пациентите с неврологична симптоматика и се свързват с повишен риск за неврологична изява на болестта сред българската популация, а *IL-17RC +6313C* алелът и *CC* генотипът определят появата на артрит. Въпреки че не откриваме асоциация между *IL-17RC rs708567* полиморфизма и възприемчивостта към СЛЕ и ЛН, трябва да се подчертае, че нашият екип е първият, който изяснява ролята на този полиморфизъм за развитието на СЛЕ и ЛН в световен мащаб.

Участието на цитокините за развитието на автоимунните болести е безспорно и се потвърждава и от настоящото проучване. *TGF- β (-509C/T) rs1800469* полиморфизмът показва, че T-алелът, асоцииран с по-високи нива на *IL-17A*, е рисков фактор за развитието на ЛН, като модулира значимо и неврологичната изява на болестта. Подобни резултати показват, че откриването на конкретни генетични дефекти би могло да спомогне за селектирането на пациенти с оглед прилагането на определен вид терапевтична стратегия, като се приложи индивидуално-ориентиран подход на лечение на базата на генетичния профил на изследвания индивид.

ИЗВОДИ

Въз основа на данните от настоящето проучване могат да бъдат направени следните изводи:

1. Серумните нива на IL-17A корелират с индекса SLEDAI-2K, протеинурията и пролиферативните класове ЛН, поради което IL-17A може да служи като неинвазивен маркер за мониторинг на активността на заболяването и тежестта на лупусния нефрит, без оглед на възрастта и пола.

2. *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 и *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 полиморфизмите не влияят значимо върху секрецията на IL-17A, което определя необходимостта от търсене на други функционално активни фактори. За разлика от тях *TGF- β* (-509 C/T) rs1800469 полиморфизмът влияе индиректно върху серумните нива на IL-17A, вероятно чрез ролята му в ранната Th17-клетъчна диференциация.

3. *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 полиморфизмът не е предразполагащ фактор за развитието на СЛЕ и ЛН сред българи, но модулира клиничната изява на болестта.

4. *IL-17RC* (+6313 C/T) rs708567 полиморфизмът не е предразполагащ фактор за развитието на СЛЕ и ЛН, но определя изявата на артрит.

5. *TGF- β* (-509C/T) rs1800469 полиморфизмът има отношение към Th17/ IL-17A/ IL17-RC оста чрез влияние върху серумните нива на IL-17A и е рисков фактор както за развитието на лупусен нефрит, така и за неврологична изява на болестта.

Заклучение: Българската популация показва специфични етнически особености по отношение ролята на изследваните параметри в патогенезата и развитието на СЛЕ и ЛН. Етническите и индивидуалните особености се срещат често, водят до хетерогенност на данните и обуславят необходимостта от провеждане на независими проучвания, както и индивидуална интерпретация на генетичните резултати.

СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ

I. ТЕОРЕТИЧНИ (НАУЧНО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ) ПРИНОСИ

1. За първи път в световен мащаб е проучена ролята на *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 полиморфизма при системен лупус еритематозус и лупусен нефрит.
2. За първи път в българската популация се определя значението серумните нивата на IL-17A за развитието и клиничната изява при СЛЕ и ЛН.
3. За първи път сред българи са изследвани полиморфизмите *IL-17A* (-197G/A) rs2275913 и *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567, което допринася за обогатяване на популационните база данни.
4. Проведено е за първи път асоциативно проучване на полиморфизми в гените *IL-17A* (-197G/A) rs2275913, *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 и *TGF-β* (-509C/T) rs1800469 сред български пациенти със СЛЕ.

II. ПРИЛОЖНИ (НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИ) ПРИНОСИ

1. Създадена е ДНК банка за системен лупус еритематозус и лупусен нефрит към Молекулярен център по медицина.
2. Въведен и оптимизиран е HRMA метод за анализ на полиморфизма *IL-17A* (-197G/A) rs2275913, който би могъл да се използват в рутинната практика при изследване и на други автоимунни и малигнени заболявания.
3. За първи път е установена асоциация на T алела от *TGF-β* (-509C/T) rs1800469 полиморфизма с лупусния нефрит, което би могло да има отношение при подбора на терапевтична стратегия.
4. За първи път е установена асоциация на CC генотипа и C алела от полиморфизма *IL-17RC* (+6313C/T) rs708567 с лупусния артрит, което би могло да има отношение при избора на терапевтичен режим.
5. Серумните нива на IL-17A биха могли да бъдат допълнителен неинвазивен биомаркер за мониторинг на активността на СЛЕ и тежестта на ЛН, както и за преценка отговора към терапия.

ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Hristova M**, Kamenarska Z, Dzhebir G, Nikolova S, Hristova R, Mihova K, Vinkov A, Georgiev T, Pozharashka J, Kaneva R, Savov A, Koundurjiev A, Dourmishev L. *The role of IL-17 rs2275913, IL-17RC rs708567 and TGFβ1 rs1800469 SNPs and IL17A serum levels in patients with lupus nephritis.* Rheumatol Int. 2021;2205-2213 (IF 2021=2.631) doi:10.1007/s00296-021-04996-z (5 цитата)
2. Kamenarska Z, **Hristova M**, Dzhebir G, Nikolova S, Vinkov A, Kaneva R, Dourmishev L. *Association of IL-17RC rs708567 with systemic lupus erythematosus.* Madridge J Dermatol Res 2018; 3(1):65 doi: 10.18689/mjdr-1000114 (1 цитат)
3. Kamenarska Z, **Hristova M**, Vinkov A, Dourmishev L. *Monoclonal antibody drugs for systemic lupus erythematosus.* Folia Medica 2015; 57 (2):89-92 doi: 10.1515/folmed-2015-0025) (2 цитата)

ЦИТИРАНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Wielinska J**, Swierkot J, Kolossa K, et al. *Polymorphisms within genes coding for IL-17 A and F and their receptor as clinical hallmarks in Ankylosing Spondylitis.* **Mediators of Inflammation** 2021;1-9.
2. **Padhi S**, Sarangi S, Nayak Net al. *Interleukin-17 rs2275913 polymorphism is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus: A meta and trial sequential analysis* **Lupus** 2022;31(6) :096120332210901 doi:10.1177/09612033221090172
3. **Ali HN**, Alubaidi GT, Glorial FI, et al. *Disturbance in Serum Levels of IL-17 and TGF-β1 and in Gene Expression of ROR-γt and FOX-P3 Is Associated with Pathogenicity of Systematic Lupus Erythematosus* **Prague Medical Report** 2022;123(3):166-180 doi: 10.14712/23362936.2022.15

НАУЧНИ ДОКЛАДИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

9th Annual (Virtual) Meeting of the Lupus Academy 2020

Maria Hristova, Gyulnas Dzhebir, Lyubomir Dourmishev, Svetla Nikolova, Kalina Mihova, Anton Vinkov, Rozalia Hristova, Radka Kaneva, Zornitsa Kamenarska *Association of IL-17A rs2275913, IL-17RC rs708567 and TGFβ1 rs1800469 SNPs with systemic lupus erythematosus in Bulgarian patients nominated for Lupus Academy poster award 2020*

СЪДЪРЖАНИЕ:

ВЪВЕДЕНИЕ	5
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
1. МАТЕРИАЛИ.....	8
1.1. ИЗСЛЕДВАНИ ЛИЦА	8
1.2. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ.....	10
2. МЕТОДИ.....	10
2.1. СЕРОЛОГИЧНИ МЕТОДИ	10
2.2. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧНИ МЕТОДИ.....	11
2.3. СТАТИСТИЧЕСКИ АНАЛИЗ.....	12
РЕЗУЛТАТИ	13
1. СЕРУМНИ НИВА НА IL-17A - РОЛЯ В ПАТОГЕНЕЗАТА НА СЛЕ И ЛН	13
2. ГЕНОТИПНО ВЛИЯНИЕ ВЪРХУ ПРОДУКЦИЯТА НА IL-17A ПРИ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ЗДРАВИ И БОЛНИ ЛИЦА.....	23
3. АСОЦИАТИВНО ПРОУЧВАНЕ НА ПОЛИМОРФИЗМИ, СВЪРЗАНИ СИГНАЛНИЯ ПЪТ НА IL-17 ПРИ ПАЦИЕНТИ СЪС СЛЕ И ЛН	29
ОБСЪЖДАНЕ	38
1. СЕРУМНИ НИВА НА IL-17A - РОЛЯ В ПАТОГЕНЕЗАТА НА СЛЕ И ЛН	38
2. ГЕНОТИПНО ВЛИЯНИЕ ВЪРХУ ПРОДУКЦИЯТА НА IL-17A ПРИ ИЗСЛЕДВАНИТЕ ЗДРАВИ И БОЛНИ ЛИЦА.....	42
3. АЛЕЛНА И ГЕНОТИПНА ЧЕСТОТА НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ СРЕД БЪЛГАРСКАТА ПОПУЛАЦИЯ	46
4. ВЛИЯНИЕ НА НУКЛЕОТИДНИТЕ ПОЛИМОРФИЗМИ ВЪРХУ ВЪЗПРИЕМЧИВОСТТА И КЛИНИЧНОТО ПРОТИЧАНЕ НА СИСТЕМНИЯ ЛУПУС ЕРИТЕМАТОЗУС И ЛУПУСНИЯ НЕФРИТ	48
ОБОБЩЕНИЕ	54
ИЗВОДИ	56
СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ	56
СПРАВКА ЗА ПУБЛИКАЦИИ, ЦИТИРАНИЯ И ДОКЛАДИ	56
СЪДЪРЖАНИЕ	59

БЛАГОДАРНОСТИ:

Изказвам специални благодарности на:

Проф. д-р Атанас Иванов Кундурджиев като мой научен ръководител и на целия екип от ръководената от него Клиника по нефрология към УМБАЛ "Св. Иван Рилски". Специални благодарности на доц. д-р Милена Николова

Доц. д-р Васил Венциславов Василев като научен ръководител и колега.

Д-р Зорница Каменарска, проф. Радка Кънева, доц. Атанаска Миткова и целия екип от Молекулярния център по медицина към МУ-София

Проф. Алексей Савов и целия екип от Националната генетична лаборатория към СБАЛ „Майчин дом”

Проф. Даниела Монова и д-р Евгения Пенева от ВМИ на МВР за помощта при подбора на пациенти със СЛЕ

Д-р А. Илиев, проф. Б. Богов, проф. Б. Киперова и целия екип на Клиника по нефрология към УМБАЛ „Александровска”

Проф. Елисавета Наумова и проф. Марта Балева, както и целия екип от Клиника по клинична имунология към УМБАЛ „Александровска” за предоставената възможност да проведе имунологичните изследвания.

Доц. Любомир Дурмишев от ККВБ към УМБАЛ „Александровска”

Специални благодарности на моето прекрасно семейство за подкрепата - на моята сестра д-р Розалия Христова за помощта при статистическата обработка, на моя мъж и родителите ми, в памет на доц. Роза Димитрова (моята баба).